



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MATERIAIS RESTAURADORES SEM BIS-GMA – MITO OU
REALIDADE?**

Trabalho submetido por
Hermano João Pereira de Oliveira Garcia
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MATERIAIS RESTAURADORES SEM BIS-GMA – MITO OU
REALIDADE?**

Trabalho submetido por
Hermano João Pereira de Oliveira Garcia
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Inês Caldeira Fernandes

e coorientado por
Prof. Doutor Jorge Caldeira

outubro de 2018

Agradecimentos

À Professora Doutora Inês Caldeira Fernandes, minha orientadora quero agradecer por todo o apoio que me deu, não só durante a realização deste trabalho como também no restante período académico. A sua ajuda e disponibilidade tornaram este percurso muito mais gratificante.

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Caldeira a sua orientação durante toda a parte laboratorial deste trabalho, esclarecendo todas as dúvidas que iam surgindo e mostrando-se sempre disponível.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz e a todos os seus professores e funcionários, por terem contribuído para a minha formação profissional e pessoal.

Gostaria ainda de agradecer à minha família pelo apoio incondicional e em particular ao meu Pai, que esteve sempre presente em todos os momentos, e tenho-o como um modelo a seguir.

Aos meus colegas e amigos que me acompanham desde o início do curso, em especial ao meu colega de *box* Pedro Guerra, cujo trabalho de equipa em muito contribuiu para a nossa formação.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi analisar a composição de materiais restauradores de três marcas comerciais diferentes, e verificar a presença de monómeros de Bis-GMA na sua composição.

Materiais e Métodos: Foram preparadas amostras das resinas Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin (Micerium), Enamel *plus* HRi[®] Bio Function (Micerium), Filtek[®] One Bulk Fill Restorative (3M ESPE) e Admira[®] Fusion (VOCO) de três formas distintas: espécimes de resinas fotopolimerizadas e colocados durante 18 minutos numa solução de etanol/água; espécimes de resinas fotopolimerizadas e colocados durante 180 minutos numa solução de etanol/água; amostras de resina eluídas numa solução de acetonitrilo, sem serem fotopolimerizadas. A análise dos espécimes foi realizada através do método de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

Resultados: A resina composta Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin (Micerium), revelou na sua composição monómeros de HEMA, Bis-GMA e UDMA, a Enamel *plus* HRi[®] Bio Function (Micerium) tem na sua constituição UDMA, a Filtek[®] One Bulk Fill Restorative (3M ESPE) apresentou monómeros de UDMA e TEGDMA, e a Admira[®] Fusion (VOCO) demonstrou picos de HEMA e UDMA.

Conclusão: A libertação da maior parte dos monómeros residuais ocorre nos primeiros minutos após a polimerização, pois a diferença verificada pelo método HPLC das concentrações de monómeros detetadas entre as resinas eluídas durante 18 minutos e 180 minutos, não foi significativa. Concluiu-se que nas amostras de resinas não polimerizadas é possível detetar-se uma maior quantidade de monómeros residuais, e que o Bis-GMA apenas se encontra presente na resina Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin (Micerium).

Palavras-chave: Resina, HPLC, Monómeros, Compósito

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to analyze the composition of restorative materials from three different brands, and to verify whether or not Bis-GMA monomers are present in their composition.

Materials and Methods: Samples of the Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin (Micerium), Enamel *plus* HRi[®] Bio Function (Micerium), Filtek[®] One Bulk Fill Restorative (3M ESPE) and Admira[®] Fusion (VOCO) resins were prepared using three different methods: light-curing resin specimens placed for 18 minutes in an ethanol/water solution; light-curing resin specimens placed for 180 minutes in an ethanol/water solution; resin samples eluted in an acetonitrile solution without being photopolymerized. These samples were analyzed using the HPLC (High Performance Liquid Chromatography) technique.

Results: HEMA, Bis-GMA and UDMA monomers were found in the composite resin Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin (Micerium); UDMA monomers were detected in Enamel *plus* HRi[®] Bio Function (Micerium); UDMA and TEGDMA monomers were revealed in Filtek[®] One Bulk Fill Restorative (3M ESPE), and HEMA and UDMA peaks were obtained in Admira[®] Fusion (VOCO).

Conclusion: The release of most of the residual monomers occurs in the first minutes after polymerization. As shown in the results, the difference of the concentrations of monomers, detected by the HPLC method, between the resins eluted during 18 minutes and 180 minutes, was not significant. It was concluded that in samples of non-polymerized resins, it is possible to detect a larger number of residual monomers, and that Bis-GMA is only present in Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin (Micerium) resin.

Keywords: Resin, HPLC, Monomers, Composite

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO.....	13
1. RESINAS COMPOSTAS.....	13
1.1 MONÓMEROS PRINCIPAIS.....	14
1.1.1 BIS-GMA.....	14
1.1.2 BIS-EMA.....	15
1.1.3 UDMA.....	16
1.1.4 TEGDMA.....	16
1.2 CONTEXTO HISTÓRICO.....	17
1.3 VANTAGENS DAS RESINAS COMPOSTAS.....	20
1.4 TIPOS DE RESINAS COMPOSTAS.....	22
1.4.1 Compósitos Tradicionais (Macroparticulados).....	23
1.4.2 Compósitos Microparticulados.....	23
1.4.3 Compósitos Híbridos.....	23
1.4.4 Compósitos Nanohíbridos.....	24
1.4.5 Ormocers.....	24
1.5 BIOCOMPATIBILIDADE, BIODEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DOS MATERIAIS RESTAURADORES DENTÁRIOS.....	25
2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES PRESENTES EM RESINAS COMPOSTAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA...33	33
3. OBJETIVO.....	35
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
1. Materiais.....	37
2. Métodos.....	41
III. RESULTADOS.....	47
IV. DISCUSSÃO.....	61
V. CONCLUSÕES.....	67
1. Conclusão.....	67
2. Perspetivas Futuras.....	67
VI. BIBLIOGRAFIA.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular dos monómeros mais comuns das resinas compostas (adaptado de Gajewski et al., 2012).....	14
Figura 2 - Evolução dos compósitos dentários ao longo do tempo (adaptado de Ferracane, 2011)	18
Figura 3 - Representação dos tipos de preenchimento das resinas por partículas inorgânica (adaptado de Ferracane, 2011).....	24
Figura 4 - Resinas compostas utilizadas no estudo (da esquerda para a direita Enamel <i>plus</i> HRi® Universal Dentin, Enamel <i>plus</i> HRi® Bio Function, Filtek® One Bulk Fill Restorative, Admira® Fusion).....	37
Figura 5 - Cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom®	39
Figura 6 - Spectrafuge® 24D Digital Microcentrifuge.....	40
Figura 7 - Vórtex Thermolyne Maxi Mix Plus®	40
Figura 8 - Fotopolimerizador LED	40
Figura 9 - Sistema de água ultrapura, Synergy®	41
Figura 10 - <i>Pellet</i> de resina colocado no molde.....	42
Figura 11 - Procedimentos para a preparação das amostras de resina polimerizada	43
Figura 12 - Procedimento da preparação das amostras de resina não polimerizada.....	44
Figura 13 - Injeção da amostra no cromatógrafo	45
Figura 14 - Processo de separação das amostras polimerizadas	45
Figura 15 - Processo de separação das amostras não polimerizadas	45

Figura 16 - Cromatograma das soluções padrão de HEMA, TEGDMA, MMA e UDMA	47
Figura 17 - Cromatograma do compósito Enamel <i>plus</i> HRi® Universal Dentin polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 18 minutos.	48
Figura 18 - Cromatograma do compósito Enamel <i>plus</i> HRi® Bio Fuction polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 18 minutos	49
Figura 19 - Cromatograma do compósito da Filtek® One Bulk Fill Restorative polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 18 minutos.	50
Figura 20 - Cromatograma do compósito Admira® Fusion polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 18 minutos.	51
Figura 21 - Cromatograma do compósito da Enamel <i>plus</i> HRi® Universal Dentin polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 180 minutos.	52
Figura 22 - Cromatograma do compósito Enamel <i>plus</i> HRi® Bio Fuction polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 180 minutos.	53
Figura 23 - Cromatograma do compósito Filtek® One Bulk Fill Restorative polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 180 minutos.	54
Figura 24 - Cromatograma do compósito Admira® Fusion polimerizado, no qual o <i>pellet</i> foi separado da solução ao fim de 180 minutos.	55
Figura 25 - Cromatograma do compósito da Enamel <i>plus</i> HRi® Universal Dentin não polimerizado.	56
Figura 26 - Cromatograma do compósito Enamel <i>plus</i> HRi® Bio Fuction não polimerizado.	57
Figura 27 - Cromatograma do compósito Filtek® One Bulk Fill Restorative não polimerizado.	58
Figura 28 - Cromatograma do compósito Admira® Fusion não polimerizado.	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Monómeros e fotoiniciadores presentes nas resinas compostas (adaptado de Gajewski et al., 2012)	17
Tabela 2 - Constituintes das resinas analisadas, segundo os respectivos fabricantes.....	38
Tabela 3 - Equipamento laboratorial utilizado na investigação.....	39
Tabela 4 - Monómeros identificados nos cromatogramas das resinas analisadas nos vários métodos efetuados, com indicação dos tempos de retenção (T_R) e áreas associadas aos picos (A).	60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A – Área dos picos

AcN – Acetonitrilo

Bis-DMA – Bisfenol A Dimetacrilato

Bis-EMA – Etoxilato Bisfenol A Dimetacrilato

Bis-GMA – Bisfenol A-Metacrilato de Glicidila

BPA – Bisfenol A

CIVMR – Cimento de ionómero de vidro modificado por resina

HEMA – Hidroxietil Metacrilato

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ml – mililitro

mm – milímetro

MMA – Metil Metacrilato

MSDS – *Material Safety Data Sheet*

mW/cm² – MiliWatt(s) por centímetro quadrado

nm – nanómetro

TEGDMA – Trietilenoglicol Dimetacrilato

T_R – Tempo de retenção

UDMA – Dimetacrilato de Uretano

μm – micrómetro

I. INTRODUÇÃO

1. RESINAS COMPOSTAS

As resinas compostas dentárias consistem geralmente numa mistura com duas componentes principais: uma matriz orgânica de monómeros de dimetacrilato e metacrilato e uma componente de partículas inorgânicas, relacionadas através de um agente de ligação (silano) responsável pela sua conexão. Fazem parte da mistura resinosa estabilizadores (ex: benzofenona) e um sistema fotoiniciador (ex: canforoquinona) (Andreani et al., 2012; Durner et al., 2010; Gul, Miloglu, & Akgul, 2014; Mousavinasab, 2011).

Apesar da importância dos monómeros de metacrilato e dimetacrilato na estrutura dos compósitos, o principal componente da maioria das resinas é o preenchimento com partículas inorgânicas. Tratam-se de substâncias relativamente inertes cuja principal função é proporcionar uma melhor resistência e módulo de elasticidade, menor contração de polimerização, incorporação de água e reforço da estrutura química da resina (Andreani et al., 2012; Liu et al., 2014; Kim, Kim, Kim, Cho, & Kim, 2006).

Em termos de preenchimento inorgânico, nas resinas compostas dentárias podemos encontrar diversos tipos de partículas, como por exemplo o quartzo, borossilicato, vidros de silicato de alumínio e lítio, e ainda sílica amorfa. De forma a tornar estes materiais radiopacos, e passíveis de visualização radiográfica, são adicionados vidros de óxido de bário, estrôncio, zinco ou outros metais (Randolph, Palin, Leloup, & Leprince, 2016).

A parte orgânica representa entre 10% a 30% do peso total da resina, e é composta principalmente por moléculas polimerizáveis (Andreani et al., 2012).

Atualmente, na matriz orgânica dos materiais de restauração dentária baseados em resina, existem três monómeros principais que são frequentemente encontrados na sua

estrutura molecular: o Bisfenol A-Metacrilato de Glicidila (Bis-GMA), Trietilenoglicol Dimetacrilato (TEGDMA) e Dimetacrilato de Uretano (UDMA) (Gul et al., 2014) (Figura 1).

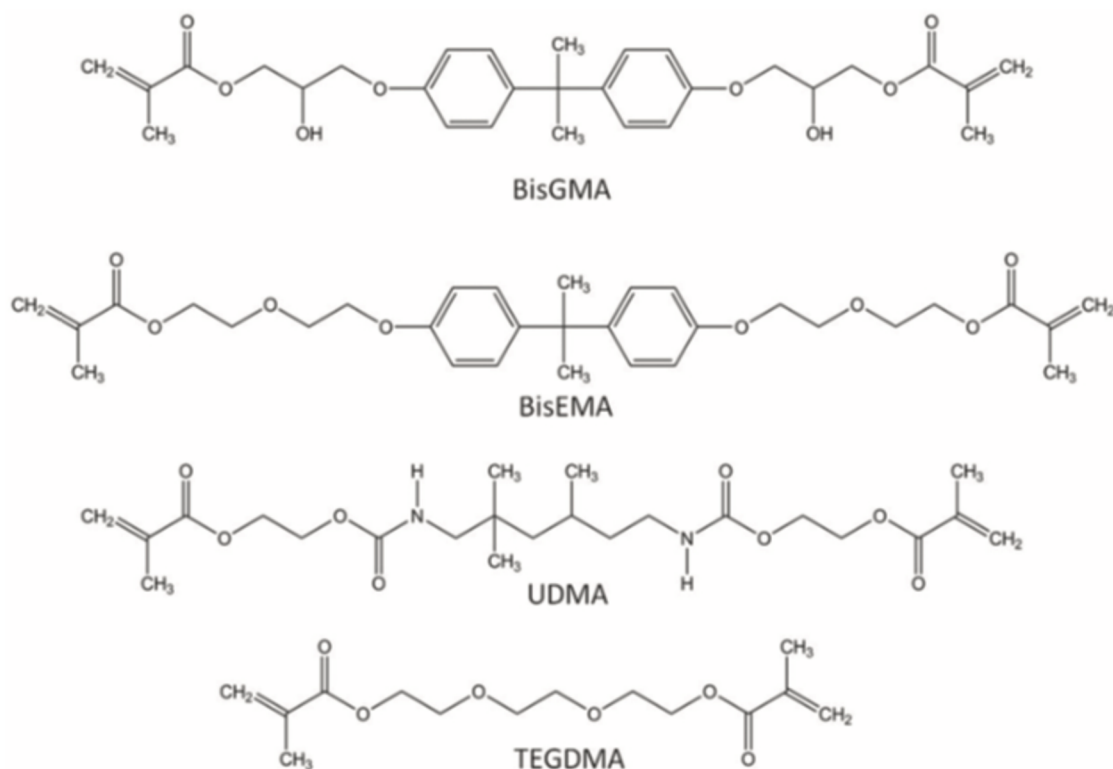


Figura 1 - Estrutura molecular dos monómeros mais comuns das resinas compostas (adaptado de Gajewski et al., 2012)

1.1 MONÓMEROS PRINCIPAIS

1.1.1 BIS-GMA

O monómero de base das resinas mais comum é o Bis-GMA, de alta viscosidade, que normalmente é diluído em outros monómeros detentores de uma viscosidade mais reduzida (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013; Gajewski, Pfeifer, Fróes-Salgado, Boaro, & Braga, 2012; Ogliari et al., 2008).

O Bis-GMA é um monómero dimetacrilato largamente utilizado na produção de resinas compostas dentárias. A sua estrutura aromática rígida principal (Figura 1) confere propriedades mecânicas aos materiais, que são necessárias à boa prática clínica (Ogliari et al., 2008).

O Bis-GMA é obtido através da reação de adição de metacrilato de glicidila com bisfenol A, ou em alternativa pela reação de ácido metacrílico e do éter diglicidílico do bisfenol A. Durante este processo ocorre a abertura do anel do grupo epóxido e é formada uma ligação éter em conjunto com um grupo álcool secundário. Estes hidroxilos têm influência nas propriedades físico-químicas dos monómeros, sendo um fator que afeta a sua viscosidade (Ogliari et al., 2008).

Estas propriedades inconvenientes incentivaram, de certo modo, a realização de diversos estudos sobre a síntese orgânica de análogos do Bis-GMA (Ogliari et al., 2008).

Uma série de diferentes análogos aromáticos do Bis-GMA, em particular de dimetacrilatos, que facilitam a formação de redes densamente reticuladas, é atualmente comercializada (Ogliari et al., 2008; Andreani et al., 2012).

Estes monómeros apresentam menor viscosidade que o Bis-GMA e parecem ser compostos interessantes para integrar um grande número de materiais dentários. O Etoxilato Bisfenol A Dimetacrilato (Bis-EMA) é um desses produtos (Ogliari et al., 2008; Andreani et al., 2012).

1.1.2 BIS-EMA

O monómero hidrofóbico Etoxilato Bisfenol A Dimetacrilato (Bis-EMA) é amplamente utilizado em sistemas adesivos *etch and rinse*, e está também presente em compósitos resinosos como base da mistura monomérica, diluído em outros monómeros de menor peso molecular. Este monómero, com um peso molecular de 540 g/mol, superior ao Bis-GMA (ver Tabela 1), não contém grupos OH livres na sua estrutura, característica que conduz à redução da viscosidade da resina (Andreani et al., 2012; Gajewski et al., 2012).

Esta é uma grande vantagem do Bis-EMA quando comparado a outros dimetacrilatos, pois um compósito dentário que apresente uma baixa viscosidade, irá permitir um maior preenchimento por partículas inorgânicas, favorecendo assim as propriedades mecânicas da resina. Apesar da sua menor viscosidade, o Bis-EMA ainda apresenta uma baixa conversão de ligações duplas, principalmente devido ao impedimento estérico (Andreani et al., 2012; Gajewski et al., 2012).

1.1.3 UDMA

Outros monómeros, de grande peso molecular, foram desenvolvidos e introduzidos nos materiais comerciais de modo a superar algumas das limitações das resinas baseadas no Bis-GMA. Fórmulas com Uretano Dimetacrilato (UDMA) tornaram-se bastante comuns devido à sua viscosidade mais reduzida, e elevada flexibilidade em relação ao Bis-GMA (Gajewski et al., 2012).

Os copolímeros (polímero formado por monómeros diferentes) de UDMA geralmente apresentam uma maior resistência à flexão, módulo de elasticidade e dureza (Gajewski et al., 2012).

1.1.4 TEGDMA

Os monómeros de Trietilenoglicol-Dimetacrilato (TEGDMA), são normalmente inseridos nas fórmulas das resinas compostas com outros monómeros de maior peso molecular como o Bis-GMA e o UDMA (Tabela 1), de modo a reduzirem a viscosidade do compósito (Anusavice et al., 2013; Gajewski et al., 2012; Ogliari et al., 2008).

Contudo, este composto poderá aumentar a contração de polimerização, podendo originar um *gap* entre a restauração e o tecido dentário. Ao permitir a incorporação de água, diminui as propriedades mecânicas gerais e dificulta a estabilização da cor da restauração, podendo eventualmente prejudicar o desempenho clínico (Floyd & Dickens, 2006; Gajewski et al., 2012; Ogliari et al., 2008).

Tabela 1 - Monómeros e fotoiniciadores presentes nas resinas compostas (adaptado de Gajewski et al., 2012)

	Chemical nomenclature (IUPAC)	Molecular weight (g/mol)	Molecular Formula	Viscosity (h - Pa)	Manufacturer	Batch #
BisGMA	2,2-bis-4-2-(hydroxi-3-metacriloxiprop-1-oxi)propane	512	C ₂₉ H ₃₆ O ₈	1200	Esstech Inc., Essington, PA, USA	568-21-07
TEGDMA	Triethylene glycol dimethacrylate	286	C ₁₄ H ₂₂ O ₆	0.01	Esstech Inc., Essington, PA, USA	562-07-04
UDMA	1,6-bis-(metacriloxi-2-etoxicarbolamino)-2,4,4-trimethylexane	470	C ₂₃ H ₃₈ N ₂ O ₈	23	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA	06324EC
BisEMA	2,2-bis-4-2-(hydroxi-3-methylacriloxietoxi)-phenylpropane	540	C ₃₉ H ₄₄ O ₈	0.9	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA	03514HF
Camphorquinone	2,3-bornadenione	166	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	N/A	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA	51602-065
DMAEMA	2-(dimethylamino)ethyl methacrylate	157	C ₇ H ₁₄ NO ₂	0.9	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA	08328HC

1.2 CONTEXTO HISTÓRICO

A introdução das resinas compostas dentárias no tratamento restaurador dentário aconteceu na década de 60 (Liu et al., 2014; Kim et al., 2006).

Desde então que a utilização das resinas compostas para a realização de restaurações diretas em dentes anteriores e posteriores tem vindo a aumentar significativamente. Este facto deve-se principalmente às preferências dos doentes que optam normalmente pelas soluções mais estéticas, e também pelo receio quanto ao mercúrio presente nas restaurações feitas com amálgamas (Milnar, 2011).

Estes compósitos trouxeram inúmeras vantagens, nomeadamente no que diz respeito intervenções minimamente invasivas. Permitem uma maior preservação de estrutura dentária sã, visto não ser necessária a preparação da cavidade para a adesão mecânica, o que acontecia quando eram realizadas restaurações com amálgamas, e conferem uma aparência mais natural e estética ao dente restaurado (Milnar, 2011).

Na década de 40, os materiais utilizados em restaurações estéticas eram os cimentos de silicato que, nessa data, começaram a ser substituídos pelas resinas acrílicas. Embora se apresentassem como uma boa alternativa em relação aos silicatos, a sua adesão ainda era um dilema (Hervás-García, Martínez-Lozano, Cabanes-Vila, Barjau-Escribano, & Fos-Galve, 2006; Milnar, 2011).

No ano de 1962, Bowen desenvolveu o monómero Bis-GMA (Figura 2), de forma a tentar melhorar as propriedades físicas das resinas acrílicas, visto que os seus outros componentes apenas permitiam a polimerização em cadeia linear (Hervás-García et al., 2006; Milnar, 2011).

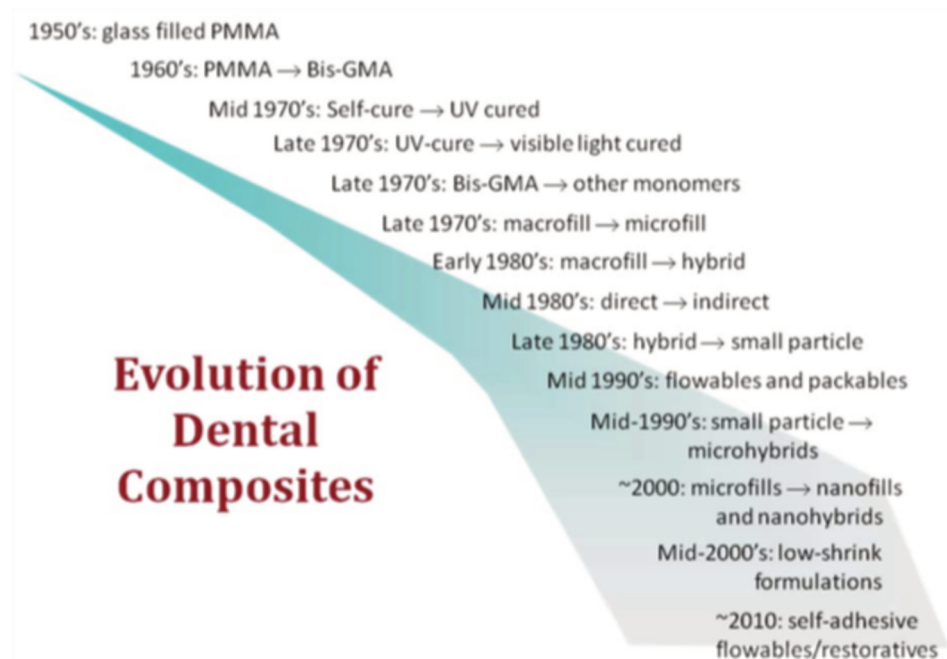


Figura 2 - Evolução dos compósitos dentários ao longo do tempo (adaptado de Ferracane, 2011)

Contudo, este material funcionava por mistura da pasta base com um catalisador o que apresentava alguns inconvenientes, como dificuldade nas proporções, o processo da mistura e ainda dificuldade na estabilização da cor (Hervás-García et al., 2006; Milnar, 2011).

Na década de 70 (Figura 2), surgiram pela primeira vez os materiais compósitos polimerizados por radiação eletromagnética, não sendo assim necessário fazer-se a mistura. Porém, estes materiais tinham partículas muito grandes o que tornava difícil o seu polimento e a sua adesão (Hervás-García et al., 2006; Milnar, 2011).

As primeiras resinas microparticuladas apareceram na década de 80. Apesar de serem mais facilmente polidas e possuírem translucidez muito semelhante ao esmalte, as suas propriedades mecânicas não são muito favoráveis, pois quando utilizadas em zonas de maior tensão apresentam uma taxa de fratura considerável. No entanto, a microinfiltração das restaurações ainda surgia como principal preocupação, com ocorrência de cáries secundárias e sensibilidade no dente restaurado. Na década de 90, porém, já existiam mais de 30 tons de compósitos disponíveis e surgiram as primeiras resinas micro-híbridas. Hoje em dia, as resinas compostas são capazes de conceber restaurações dentárias altamente estéticas, resistentes e bastante duradouras (Milnar, 2011).

Através de técnicas de estratificação na aplicação dos compósitos, conseguiu-se reduzir os problemas relacionados com a microinfiltração das restaurações, e a taxa de fratura também diminuiu significativamente (Fortin & Vargas, 2000).

Atualmente, a falha de restaurações relacionadas com o desgaste desses materiais nos dentes da região posterior da cavidade oral, é praticamente inexistente, e pode restringir-se apenas a doentes com bruxismo e apertamento dentário (Demarco, Corrêa, Cenci, Moraes, & Opdam, 2012).

Devido ao desenvolvimento de métodos de preenchimento híbrido e nano tecnológico, as resinas compostas evoluíram consideravelmente e são cada vez mais utilizadas em restaurações de dentes anteriores e dentes posteriores (Gul et al., 2014; Liu et al., 2014; Kim et al., 2006).

Os compósitos mais modernos demonstram:

- Maior resistência;
- Maior durabilidade;
- Melhor manuseamento;
- Polimento facilitado;
- Translucidez;
- Melhor adesão;
- Menor contração de polimerização;
- Resultados esteticamente satisfatórios.

(Fleisch, Sheffield, Chinn, Edelstein, & Landrigan, 2010; Liu et al., 2014; Kim et al., 2006; Milnar, 2011).

Contudo, e apesar de todos os avanços tecnológicos no âmbito da Dentisteria Restauradora, a utilização de resinas compostas em restaurações dentárias continua a estar dependente da técnica do clínico, e a contração de polimerização ainda pode representar uma contrariedade no sucesso do tratamento restaurador (Milnar, 2011).

1.3 VANTAGENS DAS RESINAS COMPOSTAS

Até à década de 80, os materiais de eleição para efetuar restaurações diretas em dentes do sector posterior eram as amálgamas (Alexander, Hopcraft, Tyas, & Wong, 2014).

Nos dias de hoje, as resinas dentárias têm sido amplamente utilizadas em substituição das amálgamas, e consideram-se materiais bastante versáteis e fiáveis no tratamento de diversos tipos de cáries (Demarco et al, 2012; Liu et al., 2014).

Quanto à utilização de amálgamas em restaurações diretas, alguns fatores alteraram o seu estatuto de principal material restaurador, entre os quais:

- a existência de melhores opções para a prevenção, o tratamento e controlo da cárie dentária;

- a maior preservação da estrutura dentária sã remanescente, visto que a retenção das amálgamas é apenas mecânica, sendo necessário fazer a preparação da cavidade (Fedorowicz, Nasser, & Wilson, 2009);

- desenvolvimento e melhoria de novos materiais restauradores;
- opções mais estéticas, preferidas pelos doentes;
- aceitação de restaurações com um tempo de vida mais reduzido;
- apreensão dos doentes quanto à utilização de amálgamas devido à presença de mercúrio na sua constituição;
- preocupações ambientais devido à utilização de mercúrio;
- melhorias também em outras áreas, como as restaurações indiretas (Alexander et al., 2014; Gordan et al., 2012;).

As amálgamas dentárias foram substituídas pelas resinas compostas em várias situações clínicas. Apesar de todas as vantagens que os compósitos apresentam, as amálgamas possuem uma maior resistência ao desgaste e à compressão, menor probabilidade de fratura e de microinfiltração, e conseqüentemente, menos propensão a cárie secundária. Adicionalmente, trata-se de um procedimento mais rápido, não sendo tão sensível à técnica do clínico com uma restauração a resina (Alexander et al., 2014; Demarco et al, 2012; Kovarik, 2009).

A utilização de resinas compostas em restaurações de dentes posteriores ultrapassa agora o uso das amálgamas, embora a tendência seja menos acentuada em algumas regiões, como por exemplo no Reino Unido. Tal facto pode, eventualmente, dever-se a diferentes políticas locais e também ao tipo de sistema de prestação de serviços dentários, mais do que propriamente a indicações clínicas. Na prática, há um número crescente de dentistas que não utilizam amálgamas como materiais restauradores (Alexander et al., 2014; Gilmour, Latif, Addy, & Lynch, 2009).

Quanto à longevidade das restaurações, comparações entre os diferentes materiais não são fáceis de se executar, pois os dados a recolher dependem de inúmeros fatores que não são controláveis. Contudo, estudos indicam que os tratamentos restauradores dentários efetuados com amálgamas exibem maior durabilidade do que restaurações com compósitos. Com efeito, a duração média é de 10 a 15 anos para as amálgamas e de 5 a 8 anos para as resinas compostas (Kopperud, Tveit, Gaarden, Sandvik, & Espelid, 2012;

Simecek, Diefenderfer, & Cohen, 2009; Soncini, Maserejian, Trachtenberg, Tavares, & Hayes, 2007). No entanto, estes dados contradizem investigações levadas a cabo por Opdam et al., e os ensaios clínicos de Heintze & Rousson, cujos resultados demonstram longevidade semelhante entre restaurações com resinas compostas e as realizadas através de amálgamas (Heintze & Rousson, 2012; Opdam, Bronkhorst, Loomans, & Huysmans, 2010).

Apesar das diferenças consideráveis nas propriedades entre os compósitos dentários comercializados, como demonstrado em diversas análises laboratoriais (Moraes et al., 2009; Schubert, Ziegler, Bernhard, Bürgers, & Miosge, 2018; Tauböck, Jäger, & Attin, 2018), os testes *in-vitro* são limitados no que diz respeito à previsão da longevidade clínica de restaurações com resinas compostas (Demarco et al., 2012).

Dado o constante afluxo de novos materiais restauradores no mercado, e a rápida necessidade que os fabricantes têm de comprovarem a segurança clínica dos seus novos materiais, estudos clínicos de relativamente curto prazo e com um número limitado de amostras têm sido a base da inserção desses produtos no mercado. De um modo geral raramente são encontradas diferenças no desempenho dos novos produtos em relação aos anteriores, pois a maioria deles apresenta bom desempenho num curto espaço de tempo (Krämer, García-Godoy, & Frankenberger, 2005; Demarco et al. 2012).

Como tal, na tentativa de identificar as causas responsáveis pelo fracasso das restaurações, são necessários estudos com um prazo mais dilatado, de forma a obter estimativas de durabilidade das restaurações posteriores com compósitos (Demarco et al. 2012; Mitchell, Koike, & Okabe, 2007).

1.4 TIPOS DE RESINAS COMPOSTAS

As resinas compostas dentárias são categorizadas tendo em conta o tamanho médio do principal componente inorgânico presente na estrutura da resina. São necessárias partículas com diferentes tamanhos, de modo a permitir o mais elevado preenchimento possível na matriz resinosa (Anusavice et al., 2013).

1.4.1 Compósitos Tradicionais (Macroparticulados)

Estas resinas desenvolvidas na década de 70 (Figura 2), também designadas de macroparticuladas devido à grande dimensão dos seus componentes inorgânicos relativamente a outras resinas mais atuais, possuem partículas como a sílica amorfa e o quartzo. Ainda que a dimensão média destas seja de 8 a 12 μm (micrómetros), podem existir partículas com tamanhos de 50 μm . O peso do preenchimento inorgânico normalmente varia entre 70 a 80% e 60 a 70% no volume (Anusavice et al., 2013).

1.4.2 Compósitos Microparticulados

Através da incorporação de partículas de sílica coloidal, que se tratam de partículas com dimensões de cerca de 0,04 μm , aproximadamente 300 vezes menor que o tamanho médio das partículas das resinas compostas tradicionais, foram solucionados problemas como a rugosidade superficial, que dificultava o polimento da resina, e a fraca translucidez, que estavam associadas aos compósitos tradicionais. Contudo, são pouco aconselháveis por apresentarem grande absorção de água, contração de polimerização, pouca elasticidade, e quando sujeitas a forças oclusais podem facilmente fraturar (Anusavice et al., 2013; Milnar, 2011).

1.4.3 Compósitos Híbridos

São compósitos que possuem um aglomerado de partículas inorgânicas com diferentes tamanhos, partículas que vão de 0,04 μm (micrómetro) a 5 μm ocupando geralmente de 70 a 80% da resina composta híbrida (Figura 3). Apesar destes compósitos apresentarem boa capacidade de polimento e manuseio, não mantêm o brilho ao longo do tempo. De forma a ultrapassar este e outros inconvenientes, desenvolveram-se compósitos microhíbridos, com partículas de menores dimensões, de 0,06 μm a 1 μm e partículas de 40 nanómetros (nm).

Os materiais híbridos apresentam resistência favorável, o que permite a sua utilização nas regiões posteriores e anteriores como um compósito universal. A maioria dos híbridos são de viscosidade média (Alzraikat, Burrow, Maghaireh, & Taha, 2018; Ferracane, 2011; Milnar 2011).

1.4.4 Compósitos Nanohíbridos

As resinas nanohíbridas apresentam-se com nanopartículas na ordem dos 1 nm e 100 nm, combinadas com partículas microhíbridas (Figura 3). A grande maioria dos fabricantes começou a inserir nas suas fórmulas uma maior quantidade de nanopartículas de modo a melhorar as propriedades mecânicas, químicas e óticas, e alcançar um composto de resina com o melhor desempenho possível em qualquer seja a localização da sua aplicação na cavidade oral. Na generalidade, não é fácil diferenciar compósitos nanohíbridos de microhíbridos, pois características como a capacidade de resiliência e módulo de elasticidade são bastante semelhantes.

Relativamente ao desempenho clínico, dois estudos recentes mostraram resultados excelentes, em restaurações de cavidades classe II com resinas compostas dentárias nanoparticuladas, microhíbridas e nanohíbridas, com ligeira evidência de melhor adaptação marginal para as microhíbridas num estudo realizado por Krämer et al. (Alzraikat et al., 2018; Ferracane, 2011; Krämer et al., 2009).

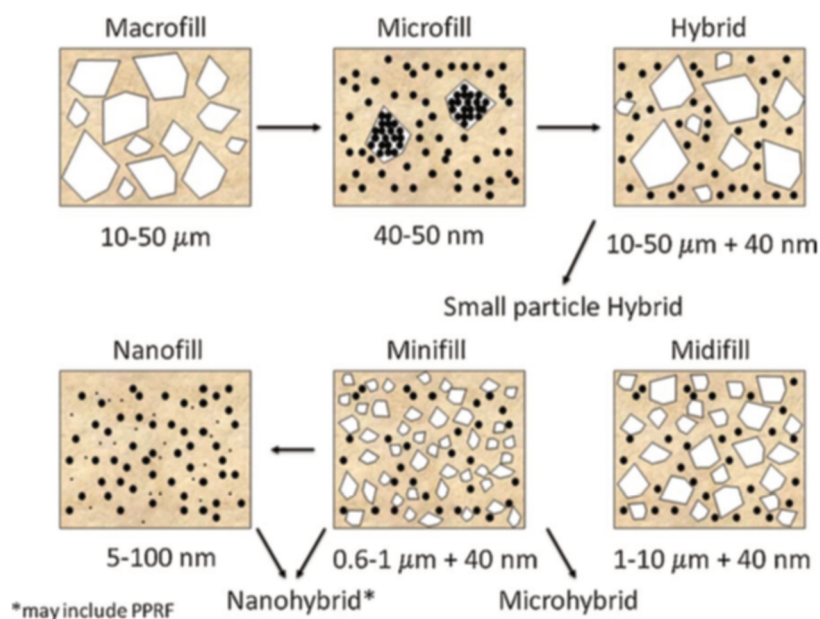


Figura 3 - Representação dos tipos de preenchimento das resinas por partículas inorgânicas (adaptado de Ferracane, 2011)

1.4.5 Ormocers

Os sistemas ormocers (cerâmica organicamente modificada) consistem em polímeros híbridos (componente orgânica e inorgânica) que, através do fenómeno de

hidrólise e condensação de alcóxidos, originam uma rede inorgânica Si-O-Si pela integração de grupos orgânicos por ligações covalentes. Uma das características destes materiais é a combinação de grupos polissiloxanos com grupos de metacrilato fotopolimerizáveis ligados covalentemente a sílica. Distinguem-se, portanto, dos compósitos tradicionais que contêm dimetacrilatos como o Bis-GMA, UDMA e TEGDMA (Llena, Fernández, & Forner, 2016; Tauböck et al., 2018).

Pelo facto deste sistema apresentar uma baixa quantidade de matriz orgânica, foi descrito que os ormocers não sofrem uma contração de polimerização tão elevada comparativamente com os materiais restauradores à base de dimetacrilatos. Contudo, estes dados acerca da tecnologia ormocer são ainda pouco conclusivos, não havendo certezas quanto à menor contração de polimerização das resinas baseadas neste sistema (Sharma, Padma, & Choudhary, 2012).

As restaurações com compósitos à base de ormocers apresentam melhor biocompatibilidade, demonstrando menor citotoxicidade em relação às resinas anteriormente referidas (Moszner, Gianasmidis, Klapdohr, Fischer, & Rheinberger, 2008; Mousavinasab, 2011).

1.5 BIOCOMPATIBILIDADE, BIODEGRADAÇÃO E TOXICIDADE DOS MATERIAIS RESTAURADORES DENTÁRIOS

A biocompatibilidade dos materiais dentários é uma consideração a ter em conta para o doente, clínico, técnico de laboratório e fabricante (Mousavinasab, 2011).

Idealmente, um material destinado ao tratamento dentário que seja inserido na cavidade oral deve ser inofensivo para todos os tecidos orais em redor, incluindo a gengiva, a mucosa, a polpa e o osso. Para além disto, deverá ser livre de substâncias tóxicas suscetíveis de serem absorvidas pelo organismo, e que podem originar efeitos adversos sistémicos, tais como efeitos teratogénicos e/ou carcinogénicos (Mousavinasab, 2011).

Aquando da reação de polimerização existe sempre uma percentagem de compostos, como monómeros residuais que não polimerizaram, partículas inorgânicas de preenchimento e outros componentes, que são libertados da resina quando o material é imerso num solvente (ex: água). Isto significa que estes produtos podem também ser libertados ao entrar em contacto com os fluidos salivares e por sua vez contactar com os tecidos da mucosa bucal.

Quando presentes em ambiente oral, estes compostos químicos podem causar irritação nos tecidos moles da boca, estimulando o crescimento de bactérias e promovendo a ocorrência de reações alérgicas.

Deste modo, a biocompatibilidade das restaurações dentárias pode ser afetada pela eluição dos componentes das resinas compostas (Gul et al., 2014).

Diversos componentes podem ser libertados de restaurações em resina composta para o ambiente oral. Deste modo, o carácter e a quantidade de substâncias que podem ser segregadas para a cavidade oral devem ser bem conhecidas (Mousavinasab, 2011).

Existem alguns estudos sobre a libertação de substâncias das resinas compostas dentárias e alguma apreensão no que diz respeito à sua biocompatibilidade, pois vários destes constituintes podem afetar o crescimento e a resposta imunitária dos fibroblastos gengivais. Na dentição permanente, as resinas compostas dentárias são neste momento o material mais importante quando falamos em materiais restauradores dentários. Na dentição primária os selantes de fissuras, cimentos de ionómero de vidro modificados por resina (CIVMR) e compómeros também assumem um papel importante (Issa, Watts, Brunton, Waters, & Duxbury, 2004; Mousavinasab, 2011).

Existem dois mecanismos principais, através dos quais ocorre a libertação de substâncias dos materiais polimerizados:

- 1 – Monómeros que não polimerizaram aquando da reação de polimerização que são eluídos pelos solventes orgânicos (ex: saliva).
- 2 – Componentes que se vão libertando ao longo do tempo devido à degradação e/ou erosão do material (Goldberg, 2008; Mousavinasab, 2011).

A degradação ou erosão do polímero pode dar-se por hidrólise ou catálise enzimática. Em geral, a degradação de um polímero é definida como um processo de

separação em cadeia, durante o qual as cadeias do polímero são fragmentadas em oligómeros e posteriormente, em situações mais avançadas, em monómeros. A erosão, por outro lado, envolve uma perda gradual dos compostos do polímero (Gajewski et al., 2012; Mousavinasab, 2011).

A intrusão de água ou outro solvente desencadeia a degradação química que resulta na formação de oligómeros e/ou monómeros. Diferentes tipos e quantidades de substâncias podem ser eluídas de resinas compostas, variando entre fabricantes. (Gupta, Saxena, Pant, & Pant, 2012). Existem diversos métodos para quantificação dos monómeros eluídos a partir de resinas compostas (Michelsen, Moe, Strøm, Jensen, & Lygre, 2008).

Estudos revelaram que as substâncias de carga inorgânica, principalmente os vidros contendo bário, eram libertados dos compósitos ficando em suspensão quando em contacto com a água. Pelo contrário, o quartzo mostrou-se significativamente mais estável em ambiente aquoso (Mousavinasab, 2011; Randolph et al., 2016).

Compostos biologicamente ativos foram identificados em substâncias libertadas da matriz orgânica das resinas. O formaldeído, que é um subproduto da polimerização, foi implicado em reações liquenóides na mucosa oral (Mousavinasab, 2011).

Algumas marcas de materiais restauradores dentários demonstraram provocar a libertação de histamina por parte dos basófilos do sangue humano em doentes com predisposição (Babakhin et al., 2008).

A função microbiana oral também é afetada pela natureza dos materiais dentários, como tem sido demonstrado vários em estudos. A libertação de cálcio, magnésio e flúor por parte dos ionómeros de vidro, é capaz de produzir alterações no metabolismo de bactérias como *Streptococcus mutans* (Fúcio et al., 2016; Mousavinasab, 2011).

A toxicidade local é baseada na interação química de substâncias tóxicas com moléculas biologicamente relevantes presentes nos tecidos. As reações locais englobam os tecidos da mucosa gengival, a polpa dentária e os tecidos dentários duros, o esmalte e a dentina (Mousavinasab, 2011).

As resinas compostas utilizadas em restaurações dentárias são consideradas citotóxicas antes da polimerização e imediatamente a seguir (Berge, Lygre, Lie, & Björkman, 2018; Mousavinasab, 2011).

Análises a CIVMR demonstraram que os monómeros de resina não polimerizados são indutores da citotoxicidade nos tecidos da cavidade oral. Os estudos concluem que os CIVMR apresentam menor biocompatibilidade que os ionómeros de vidro convencionais. A inclusão de monómeros como o HEMA, parece ser responsável pela incompatibilidade com os tecidos circundantes (Nicholson & Czarnecka, 2008; Stanislawski, Daniau, Lauti, & Goldberg, 1999).

Resinas compostas à base de Bis-GMA / TEGDMA e cimentos de resina à base de 4-META / MMA apresentam melhor biocompatibilidade quando comparadas ao cimento ionómero de vidro modificado por resina contendo 2-hidroxi-etil-metacrilato (HEMA), sugerindo que estas apresentam menor influência na regeneração de tecidos periapicais ou periodontais (Imazato et al., 2010).

As partículas resultantes do desgaste por degradação mecânica da restauração, são importantes do ponto de vista clínico. Os compósitos dentários mais atuais mostram uma adequada resistência ao desgaste intraoral, mesmo durante longos períodos de tempo. Apresentam um potencial de citotoxicidade baixo, o que previne a ocorrência de efeitos adversos que poderiam resultar da ingestão dos detritos provenientes da degradação da restauração (Mousavinasab, 2011; Salgado et al., 2017).

Fazem parte da composição dos monómeros presentes na estrutura química das resinas compostas uma substância designada de bisfenol A, podendo ser encontrada em monómeros como o Bis-GMA (Dursun, Fron-Chabouis, Attal, & Raskin, 2016).

O bisfenol A ou BPA é uma substância química sintética utilizada a nível mundial na produção de produtos de plástico, principalmente recipientes de polycarbonato, garrafas de água, tampas de garrafa, etc. (Cao, Corriveau, & Popovic, 2010; Fleisch et al., 2010).

Os derivados do BPA são componentes dos materiais à base de resina, presentes em selantes, cimentos e compósitos dentários que são cada vez mais utilizados em cuidados de medicina dentária preventiva e restauradora (Fleisch et al., 2010).

O BPA foi pela primeira vez sintetizado há cerca 100 anos, e foi reconhecido como possuidor de propriedades estrogénicas na década de 30. Porém, dados mais recentes revelam que a exposição ao BPA, pode provocar efeitos nocivos para a saúde, principalmente durante o desenvolvimento infantil (Berge et al., 2018; Fleisch et al., 2010).

Ainda assim, a extrapolação da maior parte dos estudos sobre o BPA para seres humanos é difícil, pois a maioria das análises experimentais são realizadas em roedores, e existe um debate na literatura que remete para as diferentes propriedades toxicocinéticas (farmacocinéticas) entre os humanos e os roedores (Dekant & Völkel, 2008; Fleisch et al., 2010).

Embora o bisfenol A em estado puro não seja um componente das resinas dentárias, este já foi detetado na saliva após a colocação de uma restauração a resina, resultando da hidrólise do bisfenol A dimetacrilato (Bis-DMA) pelas esterases salivares. O Bis-DMA hidrolisa-se através das suas ligações éster, libertando uma quantidade de BPA que não é desprezável (Dursun et al., 2016; Fleisch, 2010). E embora o Bis-DMA tenha sofrido hidrólise em BPA, o Bis-GMA não sofre essa reação, pois sua estrutura química possui ligações éter estáveis que evitam a hidrólise quando em contacto com a saliva (Dursun et al., 2016; Fleisch et al., 2010).

Diversos estudos analisaram a quantidade de BPA e dos seus derivados presentes na saliva e na urina após a polimerização de uma restauração feita em resina composta contendo pelo menos um desses monómeros. Os resultados não são esclarecedores: alguns estudos *in-vitro* e *in-vivo* detetaram doses muito baixas e outros nem sequer detetaram qualquer vestígio de BPA (American Dental Association Council on Scientific Affairs, 2014; Dursun et al., 2016; Kingman et al., 2012).

A presença de BPA fora da matriz de resina, resultaria da eluição de impurezas aquando da polimerização do compósito ou da sua degradação. Estas variações nos

resultados obtidos podem ser explicadas pela diferente suscetibilidade dos monómeros derivados do BPA à hidrólise pelas esterases salivares, e ainda podem estar relacionadas com a técnica de deteção. Um estudo recente de Gayrard et al. (2013), mostrou que ocorria absorção de BPA na zona sublingual em cães, entrando em circulação (Berge et al., 2018; Dursun et al., 2016; Gayrard et al., 2013; Van Landuyt et al., 2011).

Um estudo levado a cabo por Maserejian et al. (2016), revelou que as restaurações a resina composta em crianças e adolescentes está relacionada com um aumento das concentrações urinárias de BPA 24 horas após o tratamento, mas sem qualquer alteração detetável aos 14 dias ou 6 meses (Berge et al., 2018; Maserejian et al., 2016).

Os resultados de pesquisas *in-vitro* e *in-vivo* indicaram que as substâncias potencialmente causadoras de efeitos adversos nos doentes, são libertadas principalmente nas primeiras de 24h após a polimerização. A eluição pode dar-se nesta fase inicial devido à polimerização incompleta do material (Berge et al., 2018).

Visto não existir aumento da concentração média de BPA no organismo aos 14 dias e aos 6 meses, os resultados desta investigação não suportam a teoria de que existe exposição mensurável contínua de BPA após o tratamento dentário com compósitos (Maserejian et al., 2016).

Desta forma pode-se afirmar que a exposição ao BPA, após a colocação do selante ou restauração, é presumivelmente um evento transitório, ou seja os monómeros residuais não polimerizados são eluídos do polímero na saliva e absorvidos apenas nos primeiros minutos depois da aplicação da resina, apresentando assim pouco risco de exposição crónica de BPA (Fleisch et al., 2010).

Semelhante ao estrogénio estradiol, que é uma hormona responsável pelo desenvolvimento das características sexuais femininas, o BPA liga-se fortemente aos recetores estrogénios nucleares, mas há evidências que sugerem uma ação mais potente nos recetores de membrana (Berge et al., 2018; Fleisch et al., 2010; Mousavinasab, 2011).

Estudos em animais revelaram alguns efeitos adversos causados devido à exposição ao BPA, tais como aumento do peso uterino, dilatação vaginal prematura e

aumento da diferenciação e proliferação de células epiteliais mamárias em roedores fêmeas. O aumento da próstata também foi observado em ratos machos expostos ao BPA durante período pré-natal (Berge et al., 2018; Fleisch et al., 2010).

Outros estudos em animais, demonstraram efeitos associados a défices hormonais, incluindo diminuição do número de filhos nascidos e peso reduzido na altura do nascimento após exposição pré-natal de alta concentração, e início da puberdade mais tardio. Contudo estes dados são relativos, visto que as propriedades toxicocinéticas entre roedores e humanos são diferentes (Dekant & Völkel, 2008; Fleisch et al., 2010).

Embora a estrogenicidade do BPA tenha sido comprovada em estudos *in-vitro* e *in-vivo*, apenas algumas investigações testaram a estrogenicidade dos derivados do BPA. Estas pesquisas foram efetuadas principalmente *in-vitro*, e consideraram que o Bis-DMA é estrogénico, mas que o Bis-GMA, componente com maior presença na fórmula das resinas dentárias, não apresenta reações estrogénicas. Por exemplo, o BPA, o Bis-DMA e o BPA éter diglicidílico de alta concentração, mostraram ser indutores da proliferação de uma linha celular de cancro da mama. São agonistas do estrogénio, antagonistas androgénicos, bloqueando a ação da diidrotestastrona, e inibidores da atividade da aromatase ao nível do recetor (Bonefeld-Jørgensen, Long, Hofmeister, & Vinggaard, 2007; Mousavinasab, 2011).

Um estudo *in-vivo* realizado por Mariotti et al., examinou a atividade estrogénica do Bis-GMA. Conclui-se que doses altas de Bis-GMA administradas subcutaneamente em ratos, faziam com que o peso uterino e o conteúdo em colagénio aumentassem. No entanto não houve alteração no tamanho, ou no número de células uterinas, o que pode significar que o aumento do peso uterino ocorreu devido a um efeito trófico, resultante do aumento de colagénio, e não devido a efeito estrogénico.

Mesmo que se tivesse detetado um verdadeiro efeito estrogénico, a fórmula química do Bis-GMA usada nesta investigação apenas contém BPA como impureza, e as doses subcutâneas máximas eram consideradas suprafisiológicas (Berge et al., 2018; Fleisch et al., 2010; Hegde & Wali, 2015; Mariotti, Söderholm, & Johnson, 1998).

Estudos epidemiológicos em humanos, com averiguação dos efeitos clínicos resultantes da exposição ao BPA são escassos. Alguns estudos revelaram uma associação

entre o BPA e o baixo nível de FSH (hormona estimulante dos folículos), níveis altos de testosterona em homens e mulheres, síndrome do ovário poliquístico, e abortos espontâneos recorrentes (Berge et al., 2018; Fleisch et al., 2010; Sugiura-Ogasawara, Ozaki, Sonta, Makino, & Suzumori, 2005).

No entanto, sabe-se que a exposição ao BPA afeta a fisiologia do sistema nervoso central (SNC) em qualquer etapa da vida. Porém, o cérebro encontra-se mais vulnerável durante o seu desenvolvimento. A estrutura química lipofílica do BPA permite-lhe atravessar facilmente tanto a barreira placentária como a barreira hematoencefálica (Negri-Cesi, 2015; Nishikawa et al., 2010). Este composto pode ser também transmitido através do aleitamento materno (Zimmers et al., 2014).

Contudo, é importante referir que o risco apresentado nas concentrações a que os doentes estão expostos clinicamente é relativo, pois a maioria dos testes realizados que podem produzir algum tipo de efeito adverso, são realizados com altas doses de exposição a estes compostos em animais, o que não é representativo das situações clínicas diárias (Mousavinasab, 2011).

2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES PRESENTES EM RESINAS COMPOSTAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A quantidade de monómeros libertados dos materiais restauradores dentários, pode ser calculada por diversas técnicas, incluindo Cromatografia Gasosa (GC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), cromatografia gasosa / espectrometria de massa, e ionização por *electrospray* / espectrometria de massa. O método mais comumente utilizado para a determinação desses monómeros é o método de HPLC (Gul et al., 2014).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, também conhecida como Cromatografia Líquida de Alta Pressão, é uma técnica analítica frequentemente utilizada para a separação, identificação e quantificação de cada constituinte de uma mistura. HPLC é uma técnica avançada de cromatografia líquida em coluna. Na técnica de HPLC, o solvente será sujeito a altas pressões de até 400 atmosferas para que a amostra possa ser separada nos seus diferentes constituintes com a ajuda da diferença nas afinidades relativas dos compostos (Rogatsky, 2016; Thammana, 2016).

Os principais componentes da máquina de HPLC são: um reservatório de fase móvel, um desgaseificador, uma bomba responsável por movimentar a fase móvel e uma amostra através da coluna, o injetor da amostra, um compartimento de colunas com temperatura regulada, a coluna de separação que se trata de uma etapa estacionária na qual ocorre a retenção das moléculas do espécime, um detetor que analisa os tempos de retenção das moléculas da amostra, e uma interface que transfere os dados recolhidos para serem analisados num processador. O fluido pressurizado da fase móvel utilizado é normalmente uma mistura de solventes como por exemplo água e acetonitrilo ou água e metanol. A organização e a regulação da temperatura assumem um papel fundamental no processo de separação, pois vai afetar as ligações entre os segmentos do espécime e os solventes (Thammana, 2016).

Dentro do método de HPLC, existem diferentes formas para separação dos compostos de uma mistura:

- HPLC de fase normal: A separação está baseada na polaridade dos monómeros. A fase estacionária é polar, o que significa que as substâncias mais polares

são retidas na coluna, sendo registadas no cromatograma mais tardiamente do que as substâncias menos polares.

- HPLC de fase reversa: consiste numa técnica inversa à HPLC de fase normal, pelo que a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar ou hidrofóbica. Quanto mais a natureza apolar dos compostos, mais eles serão retidos na coluna.

- HPLC de exclusão de tamanho: A coluna vai incorporar moléculas do substrato, baseando-se na diferença dos tamanhos moleculares, ocorrendo a separação dos constituintes da amostra.

- HPLC de troca iónica - A fase estacionária possui carga iónica contrária à carga da amostra (Qiao, Li, Xu, & Park, 2012; Thammana, 2016).

Nesta investigação foi utilizado o método de HPLC de fase reversa para analisar a composição de diferentes resinas compostas utilizadas na prática clínica diária, e verificar a presença de determinados monómeros.

3. OBJETIVO

O objetivo desta investigação consiste na avaliação da composição de diferentes resinas compostas utilizadas como materiais restauradores dentários, e verificar se estão presentes monómeros de Bisfenol A-Metacrilato de Glicidila (Bis-GMA) em compósitos cuja composição esteja definida pelo fabricante como livre deste composto. No caso deste monómero estar presente, avaliar se ocorre liberação do mesmo.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

- Resinas

Para este trabalho de investigação utilizámos quatro resinas compostas distintas de três marcas diferentes, sendo que uma das quatro resinas utilizadas contém monómeros de Bis-GMA, de modo a fazermos a comparação com as restantes que segundo o fabricante estão livres deste composto.

As resinas compostas analisadas foram (Figura 4):

1- Enamel *plus* HRi® Universal Dentin, Micerium, *Rosbach, Germany*; Lote: 2015003369; Validade: 2020-04 (Cor A2 Escala VITA®) – com Bis-GMA.

2- Enamel *plus* HRi® Bio Function, Micerium, *Rosbach, Germany*; Lote: 2017006951; Validade: 2020-09 (Cor A2 Escala VITA®)

3- Filtek® One Bulk Fill Restorative, 3M ESPE, *Saint Paul, Minnesota, USA*; Lote: N877550; Validade: 2020-02-28. (Cor A2 Escala VITA®)

4- Admira® Fusion, VOCO, *Cuxhaven, Germany*; Lote: 1744451; Validade: 2020-02. (Cor A2 Escala VITA®)



Figura 4 - Resinas compostas utilizadas no estudo (da esquerda para a direita Enamel *plus* HRi® Universal Dentin, Enamel *plus* HRi® Bio Function, Filtek® One Bulk Fill Restorative, Admira® Fusion)

De acordo com os respectivos fabricantes, as resinas utilizadas nesta investigação possuem os seguintes constituintes indicados na Tabela 2:

Tabela 2 - Constituintes das resinas analisadas, segundo os respectivos fabricantes.

<u>Material</u>	<u>Marca</u>	<u>Matriz orgânica</u>	<u>Preenchimento inorgânico</u>	<u>Tipo de resina</u>
Enamel <i>plus</i> HRi® Universal Dentin	Micerium, <i>Italy</i>	Bis-GMA, UDMA, butandiol-MA	80% do peso e 63% do volume Óxido de nanozircónia e preenchimento com vidros	Nanohíbrida
Enamel <i>plus</i> HRi® Bio Function	Micerium, <i>Italy</i>	UDMA, dimetacrilato de dimetanol triciclododecano (TCDDMDMA)	Dióxido de silicone, vidros de bário/alumínio 74% do peso e 60% do volume	Nanohíbrida
Filtek® One Bulk Fill Restorative	3M ESPE, <i>Germany</i>	AUDMA, UDMA, 1, 12- dodecano-DMA	Sílica e zircónia livres, um composto agregado de zircónia/sílica e trifluoreto de itérbio 76,5% do peso 58,5% do volume	Nanohíbrida
Admira® Fusion	VOCO, <i>Germany</i>	Dimetacrilatos aromáticos e alifáticos e BHT (hidroxitolueno butilado)	84,0% do peso (Vidros de bário/alumínio + dióxido de silício pirogénico)	Ormocer nanohíbrido

- Reagentes

- Acetonitrilo (AcN) 99,9%
- Solução de H₂O e Etanol absoluto (25% de H₂O e 75% de Etanol)

- Equipamento Laboratorial (Tabela 3)

Tabela 3 - Equipamento laboratorial utilizado na investigação

Cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom [®] (Figura 5)
Centrifugadora - Spectrafuge [®] 24D Digital Microcentrifuge (Figura 6)
Vórtex Thermolyne Maxi Mix Plus [®] (Figura 7)
Fotopolimerizador LED (Figura 8)
Gobelés
Provetas
Micropipetas
Seringas
Tubos de <i>eppendorf</i>
Espátula Reta
Parafilme

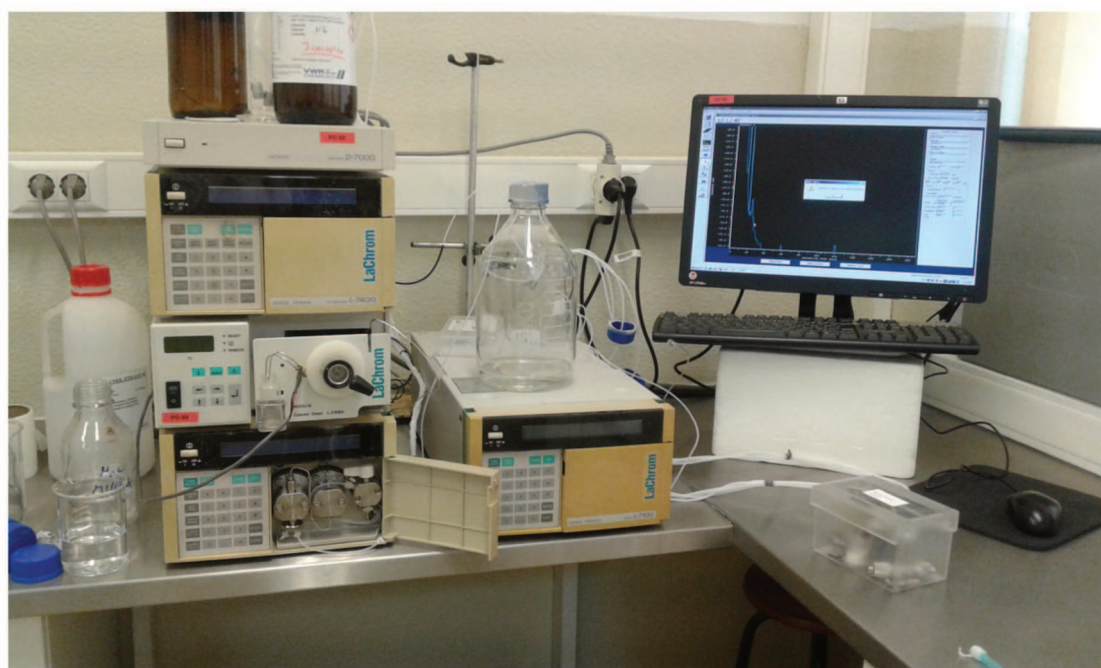
Figura 5 - Cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom[®]



Figura 6 - Spectrafuge® 24D
Digital Microcentrifuge



Figura 7 - Vórtex Thermolyne
Maxi Mix Plus®



Figura 8 - Fotopolimerizador LED

2. Métodos

- Preparação das soluções padrão

Através de soluções puras de monómeros de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), trietileno-glicol-dimetacrilato (TEGDMA), metil metacrilato (MMA) e uretano dimetacrilato (UDMA), foram preparadas soluções com AcN em 4 tubos de *ependorf* diferentes, em que se diluiu 50 μ l de cada solução de monómero puro, em 1000 μ l de AcN a 99,9%. De seguida, realizámos uma mistura de 10ml (mililitro) de água ultrapura, adquirida por meio de um sistema de pré-tratamento de água exemplificado na figura 9, com 10ml de AcN a 99,9%, numa razão de 50/50 e colocou-se a mistura numa proveta de 25ml. Por fim adicionou-se 50 μ l do conteúdo de cada tubo de *ependorf*, contendo os padrões dos monómeros, à proveta com a solução de água/acetonitrilo.



Figura 9 - Sistema de água ultrapura, Synergy®

- Preparação das amostras

As resinas utilizadas nesta investigação foram manipuladas de acordo com as instruções do respetivo fabricante. Optámos por realizar dois procedimentos distintos, num dos quais confecionámos amostras de resinas polimerizadas, e outro em que se obteve amostras de resina não polimerizadas.

- Amostras polimerizadas

Recorrendo a moldes de borracha, com medidas pré-definidas de 4mm (milímetro) de diâmetro e 2mm de altura, e a porções de parafilme de modo a isolar os moldes, confecionámos *pellets* de cada tipo de resina a estudar (Figura 10). Com uma espátula reta extraímos de cada uma das seringas uma quantidade semelhante de resina àquela retirada aquando de uma restauração dentária e colocou-se no molde compactando-se e retirando os possíveis excessos. Procedeu-se à fotopolimerização através do fotopolimerizador LED (intensidade de 21200 mW/cm² e comprimento de onda entre 420 e 480 nm) durante 40 segundos, retirámos o *pellet* do molde e colocou-se dentro de um tubo de *ependorf* juntamente com uma solução de H₂O e etanol numa razão de 25% de H₂O e 75% de etanol, de forma a permitir a libertação de monómeros presentes no compósito simulando a reação ocorrida dentro da cavidade oral quando a resina entra em contacto com a saliva.



Figura 10 - *Pellet* de resina colocado no molde

Repetimos o processo para todas as resinas em dois procedimentos diferentes esquematizados na Figura 11.

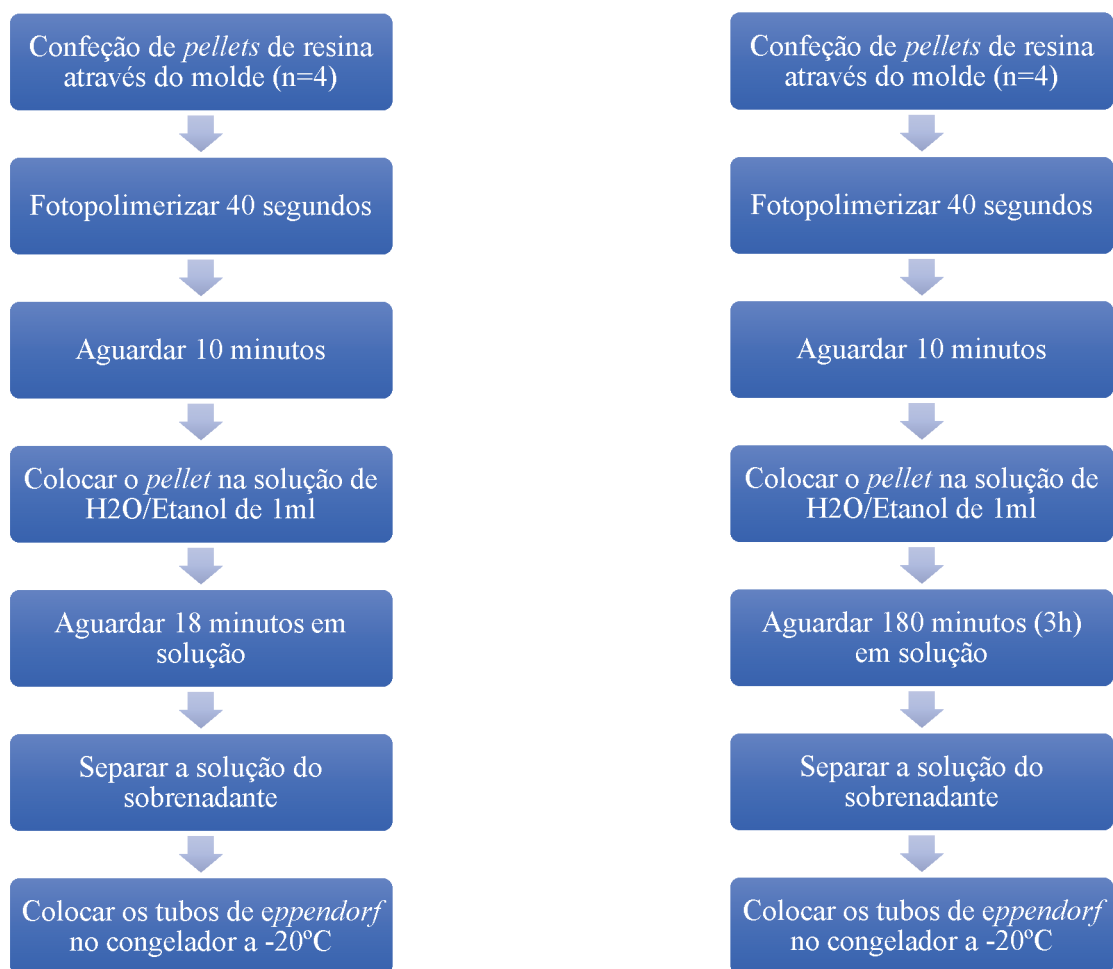


Figura 11 - Procedimentos para a preparação das amostras de resina polimerizada

- Amostras não-polimerizadas

Neste segundo procedimento começamos por envolver os tubos de *eppendorf* com papel de alumínio, de modo a impedir que as resinas neles colocadas polimerizassem pelo efeito da luz envolvente. Retiramos cerca de 500µg de resina e colocamos num tubo de *eppendorf* com 1ml de AcN para a sua dissolução. Utilizamos a máquina de vórtex para homogeneizar a solução durante três minutos e em seguida cada um dos tubos com a amostra foi colocado na centrifugadora também durante três minutos. Após a

centrifugação, separou-se a solução do sobrenadante e guardou-se ambos os tubos de cada resina no congelador a -20 graus.

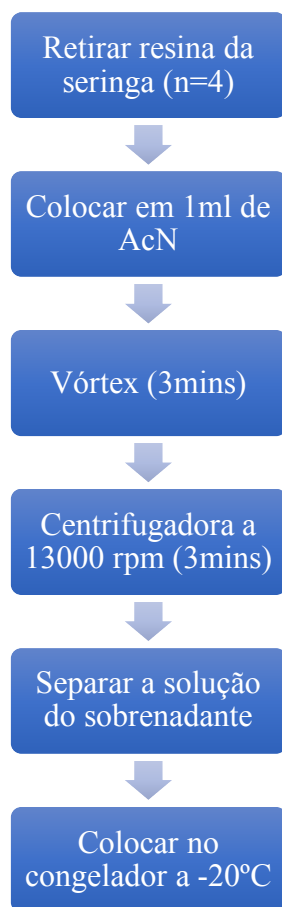


Figura 12 - Procedimento da preparação das amostras de resina não polimerizada

- Análise das amostras por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Após a obtenção das amostras, procedeu-se à sua análise através da técnica de HPLC, analisando-se cada espécime separadamente. Através de uma seringa, retirou-se cerca de 20µl da amostra e fez-se a sua injeção no cromatógrafo (Figura 13). Após cerca de 40 minutos obteve-se o cromatograma correspondente.



Figura 13 - Injeção da amostra no cromatógrafo

Estes procedimentos vão fazer com que os monómeros residuais fiquem em solução, sendo passíveis de serem detetados pelo HPLC. As figuras 14 e 15 mostram resumidamente o processo de separação dos compostos residuais em ambos os procedimentos utilizados.

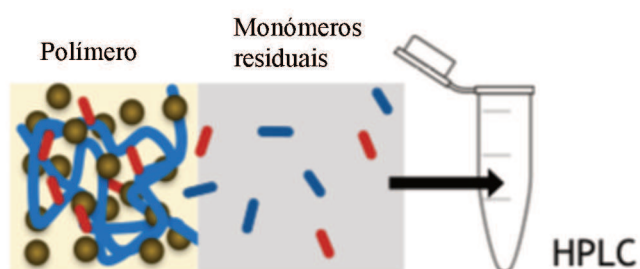


Figura 14 - Processo de separação das amostras polimerizadas

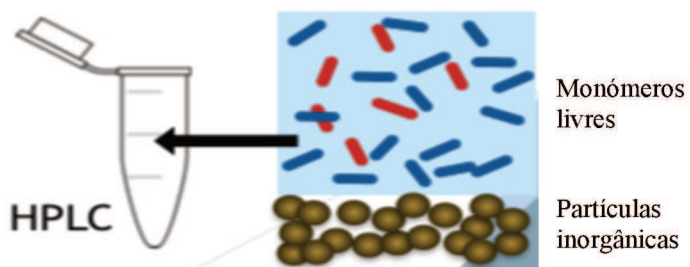


Figura 15 - Processo de separação das amostras não polimerizadas

III. RESULTADOS

O gráfico da Figura 16 representa o cromatograma da solução preparada com os padrões de HEMA, TEGDMA, MMA e UDMA, no qual se obteve o tempo de retenção (T_R) para cada um deles:

- HEMA = 2,61 minutos
- TEGDMA = 4,60 minutos
- MMA = 6,56 minutos
- UDMA = 12,58 minutos

Apesar de não ter sido possível adquirir o padrão de Bis-GMA, de acordo com a bibliografia disponível sabe-se que o seu tempo de retenção está normalmente entre os 8,7 e os 10,4 minutos (Alshali, Salim, Sung, Satterthwaite, & Silikas, 2015; Denis, Diagne, Plepis, & Viana, 2015).

Os cromatogramas indicam também a área dos picos (A), que é diretamente proporcional à concentração dos compostos detetados (Catrau & Barahona, 2015; Pina, Félix, Caldeira, & Carvalho, 2017).

Estes dados irão ser necessários para a identificação destes componentes nas amostras das resinas estudadas.

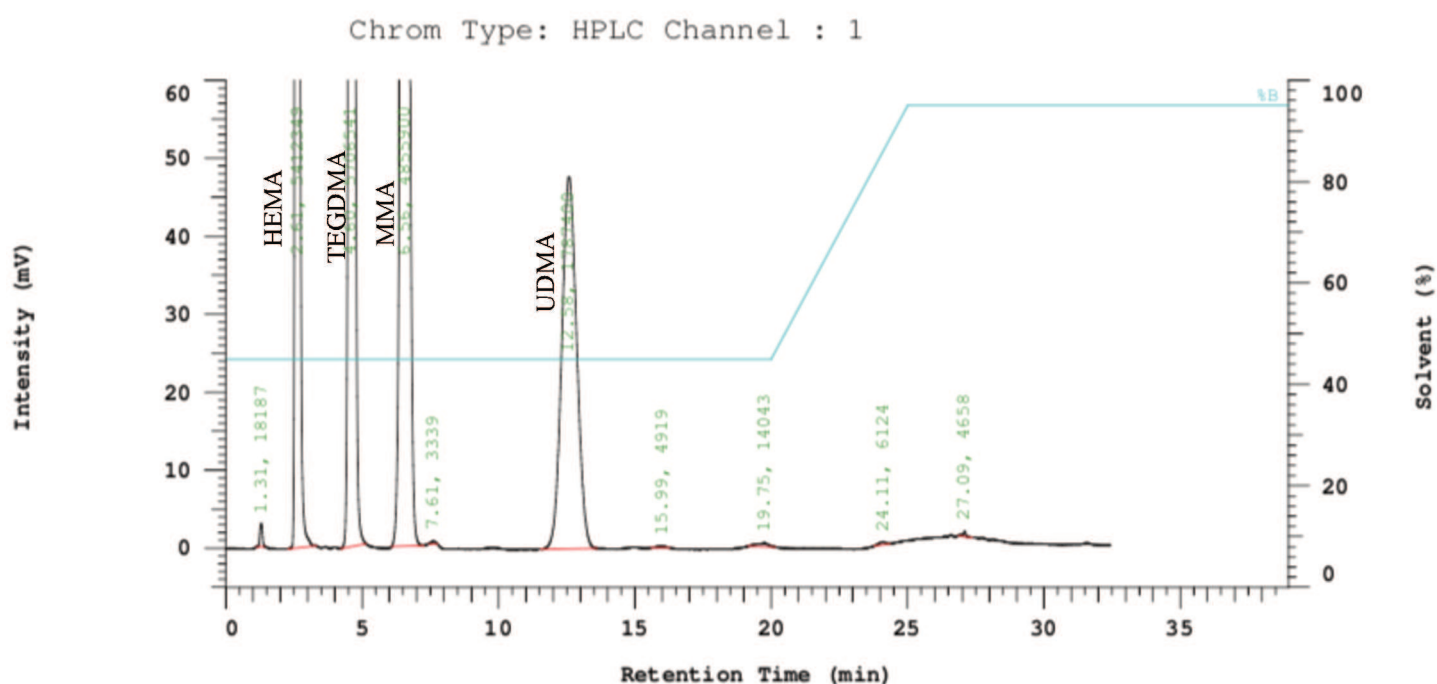


Figura 16 - Cromatograma das soluções padrão de HEMA, TEGDMA, MMA e UDMA

- A Figura 17 é relativa ao cromatograma da amostra de resina Enamel *plus* HRI[®] Universal Dentin, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 18 minutos. Comparando com os tempos de retenção dos monómeros obtidos no cromatograma das soluções padrão, podemos identificar neste gráfico HEMA ($T_R = 2,60$; $A = 30496$), Bis-GMA ($T_R = 9,56$; $A = 41254$) e UDMA ($T_R = 12,55$; $A = 30291$). Os restantes picos apresentados no gráfico representam dímeros, trímeros, tetrâmeros, copolímeros e outros oligômeros.

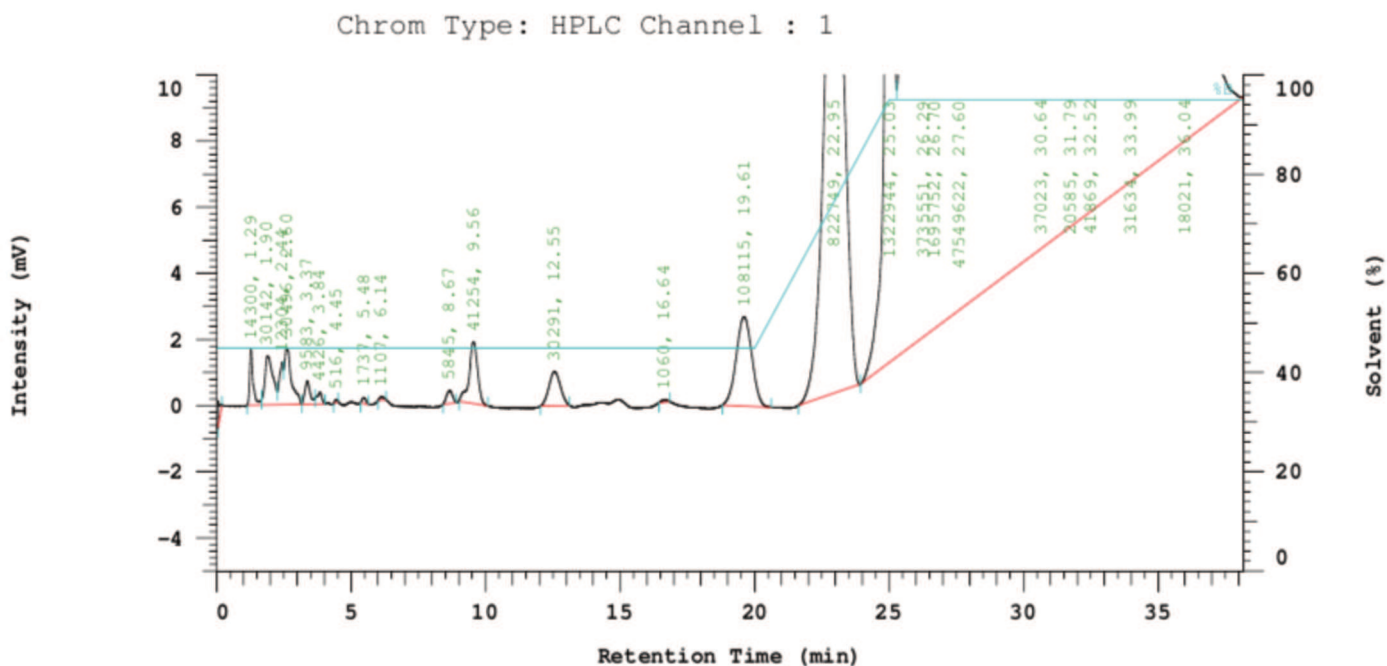


Figura 17 - Cromatograma do compósito Enamel *plus* HRI[®] Universal Dentin polimerizado, no qual o *pellet* foi separado da solução ao fim de 18 minutos.

- O gráfico da Figura 18 representa os constituintes do espécime da resina Enamel *plus* HRi[®] Bio Function, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 18 minutos. Neste cromatograma apenas conseguimos identificar monómeros de UDMA ($T_R = 12,14$; A= 12012).

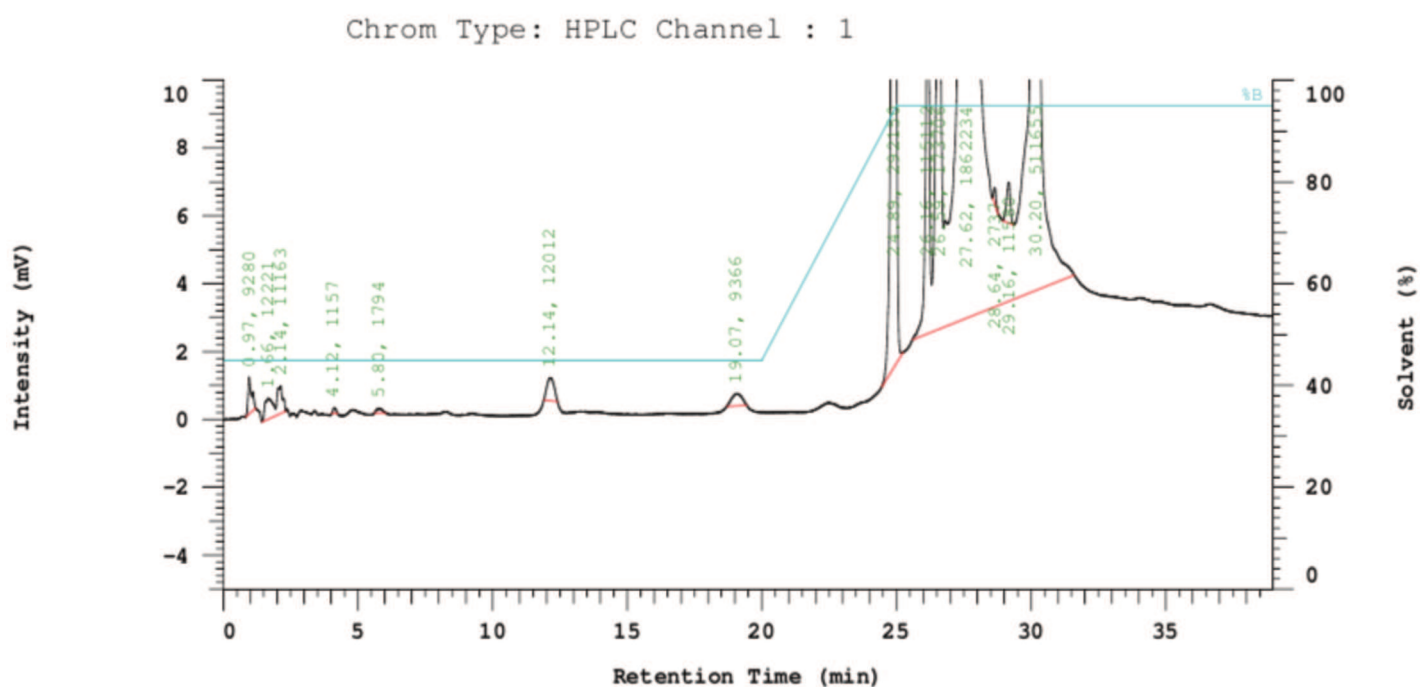


Figura 18 - Cromatograma do compósito Enamel *plus* HRi[®] Bio Fuction polimerizado, no qual o *pellet* foi separado da solução ao fim de 18 minutos

- O cromatograma da Figura 19 é referente à amostra da resina Filtek[®] One Bulk Fill Restorative, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 18 minutos. Conseguimos observar picos de TEGDMA ($T_R = 4,94$; $A = 33548$) e de UDMA ($T_R = 12,92$; $A = 3635$).

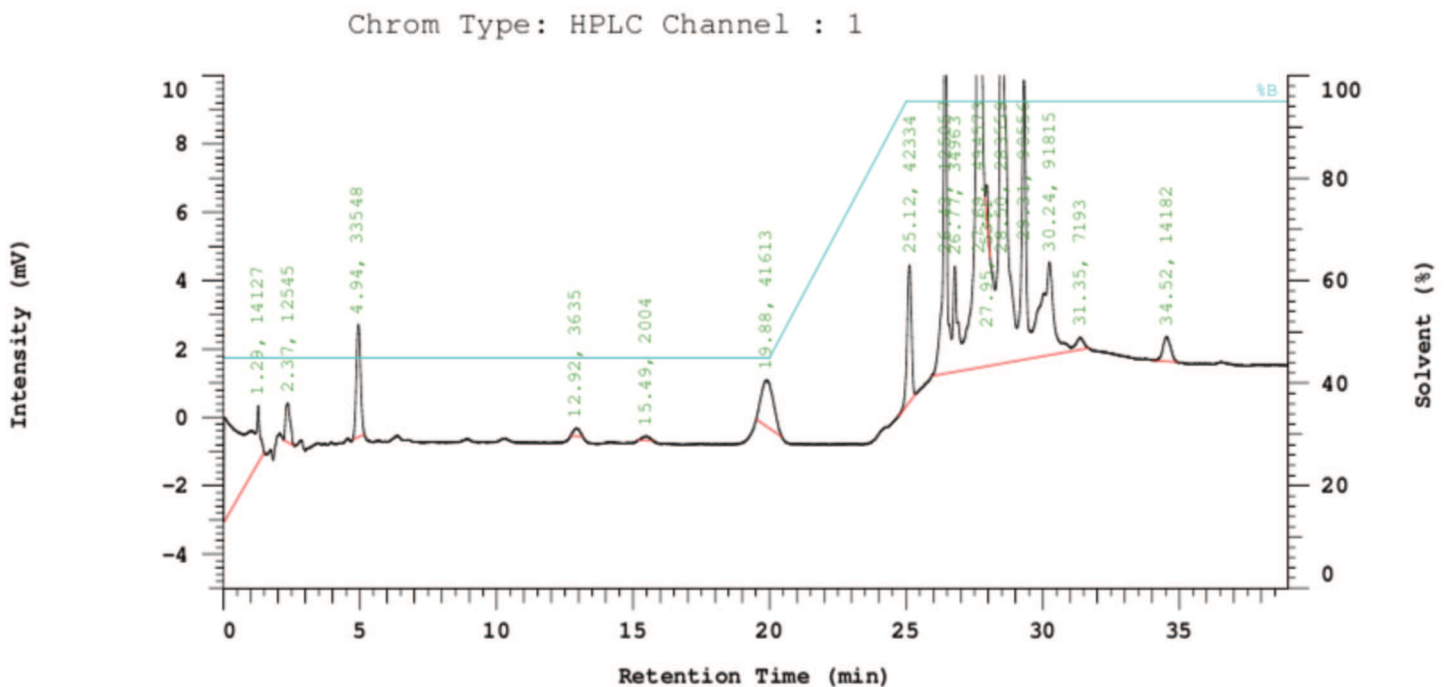


Figura 19 - Cromatograma do compósito da Filtek[®] One Bulk Fill Restorative polimerizado, no qual o *pellet* foi separado da solução ao fim de 18 minutos.

- O gráfico da Figura 20 apresenta os componentes presentes no espécime do compósito Admira[®] Fusion, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 18 minutos. Este exibe picos correspondentes a monómeros de HEMA ($T_R = 2,34$; $A = 18405$) e de UDMA ($T_R = 12,75$; $A = 6299$).

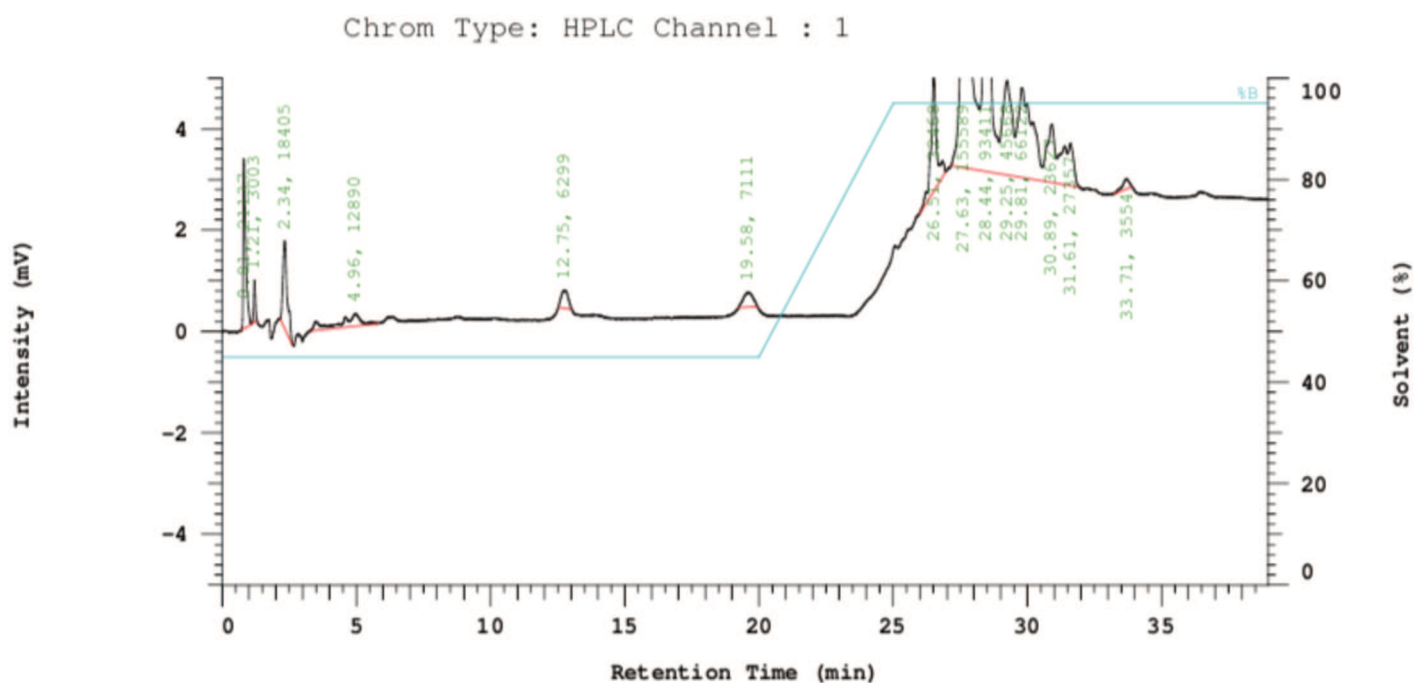


Figura 20 - Cromatograma do compósito Admira[®] Fusion polimerizado, no qual o *pellet* foi separado da solução ao fim de 18 minutos.

- A Figura 21 é relativa ao cromatograma da amostra da resina Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 180 minutos. Podemos identificar neste gráfico HEMA ($T_R = 2,41$; $A = 5824$), Bis-GMA ($T_R = 8,50$; $A = 10443$) e UDMA ($T_R = 13,07$; $A = 35073$).

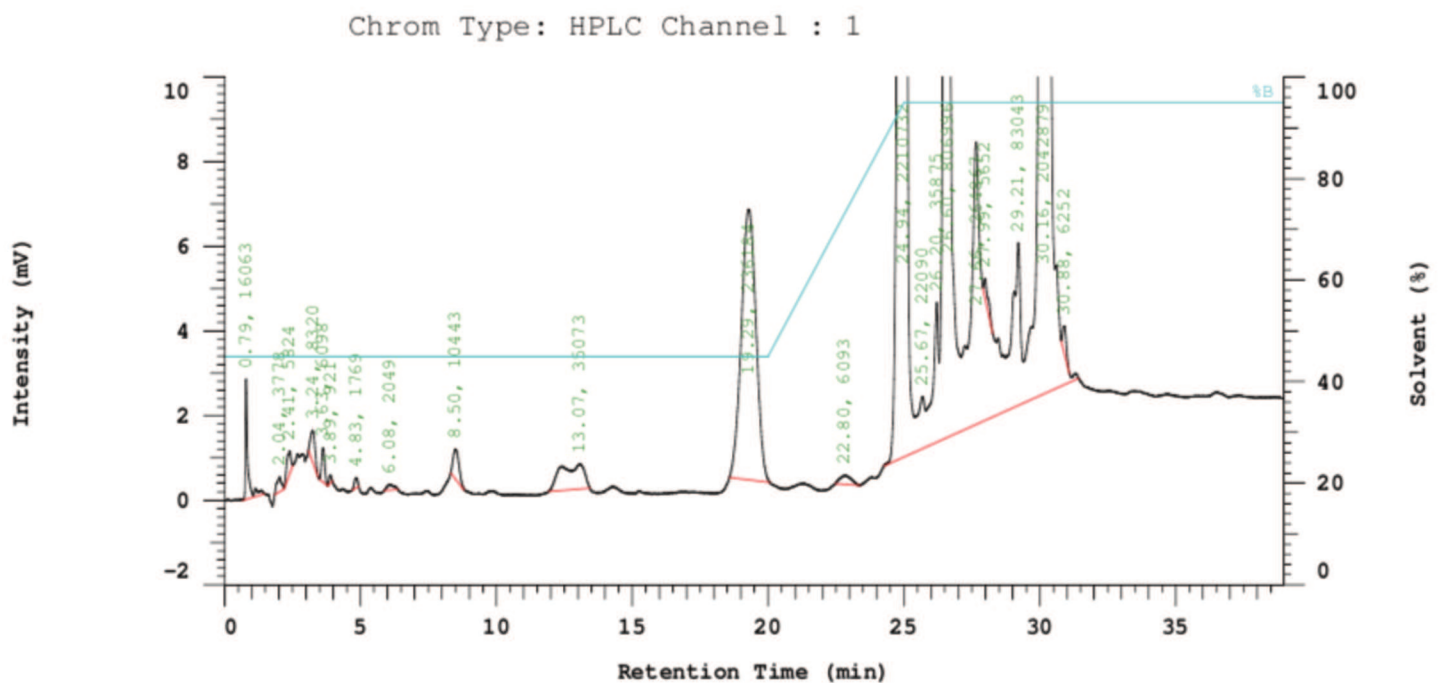


Figura 21 - Cromatograma do composto da Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin polimerizado, no qual o *pellet* foi separado da solução ao fim de 180 minutos.

- O gráfico da Figura 22 representa os constituintes do espécime da resina Enamel *plus* HRI® Bio Function, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 180 minutos. Neste cromatograma apenas identificamos monómeros de UDMA ($T_R = 12,72$; $A = 10161$).

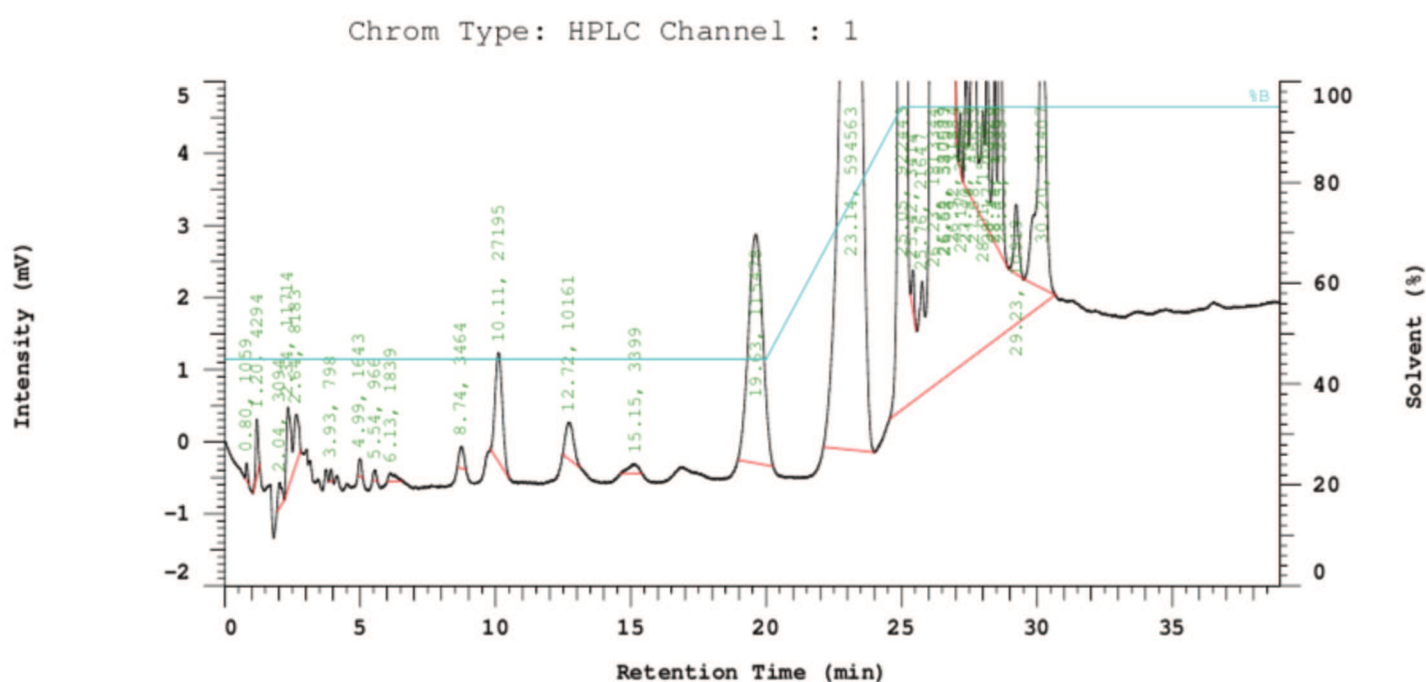
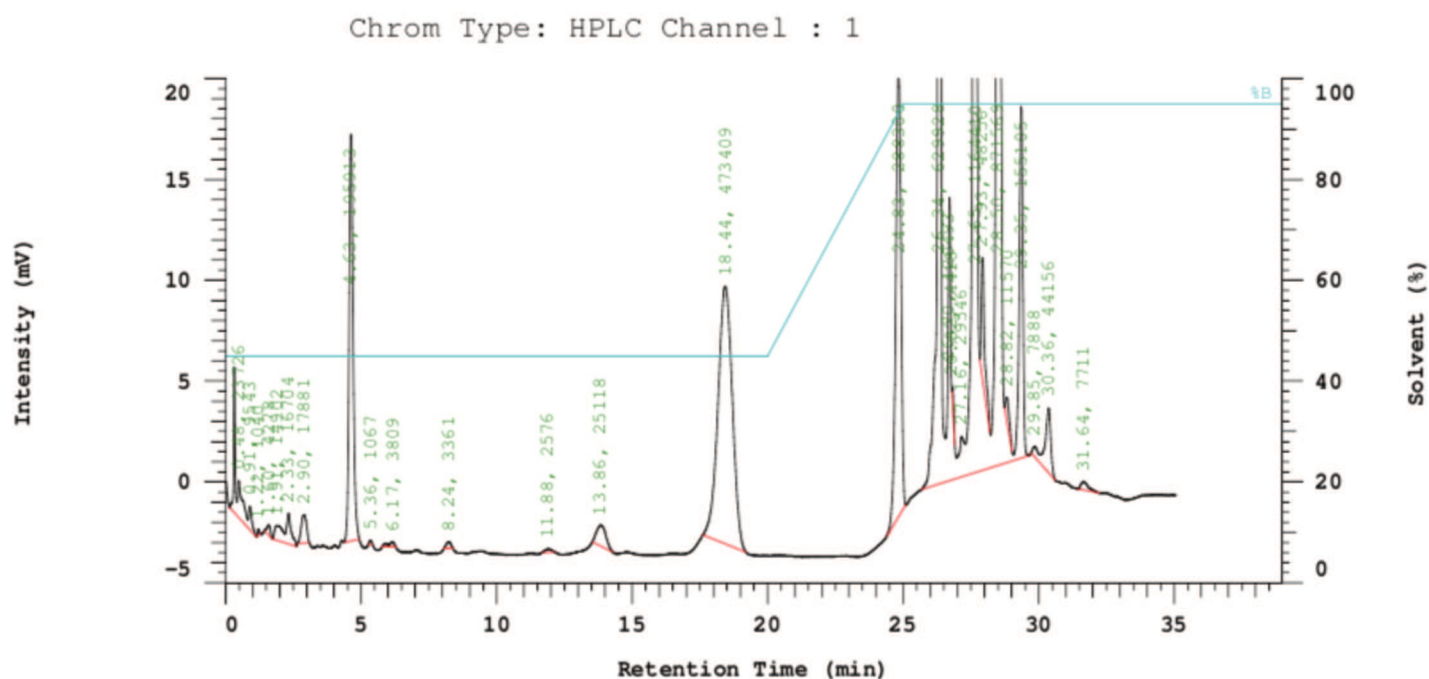


Figura 22 - Cromatograma do compósito Enamel *plus* HRI® Bio Fuction polimerizado, no qual o *pellet* foi separado da solução ao fim de 180 minutos.

- A Figura 23 é referente ao cromatograma da amostra da resina Filtek[®] One Bulk Fill Restorative, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 180 minutos. Conseguimos observar picos de TEGDMA ($T_R = 4,63$; $A = 195913$) e de UDMA ($T_R = 13,86$; $A = 25118$).



- A Figura 24 apresenta os componentes presentes no espécime do compósito Admira® Fusion, cuja separação do sobrenadante da solução se deu ao fim de 180 minutos. Este exibe picos correspondentes a monómeros de HEMA ($T_R = 2,40$; $A = 6056$) e de UDMA ($T_R = 11,62$; $A = 108740$).

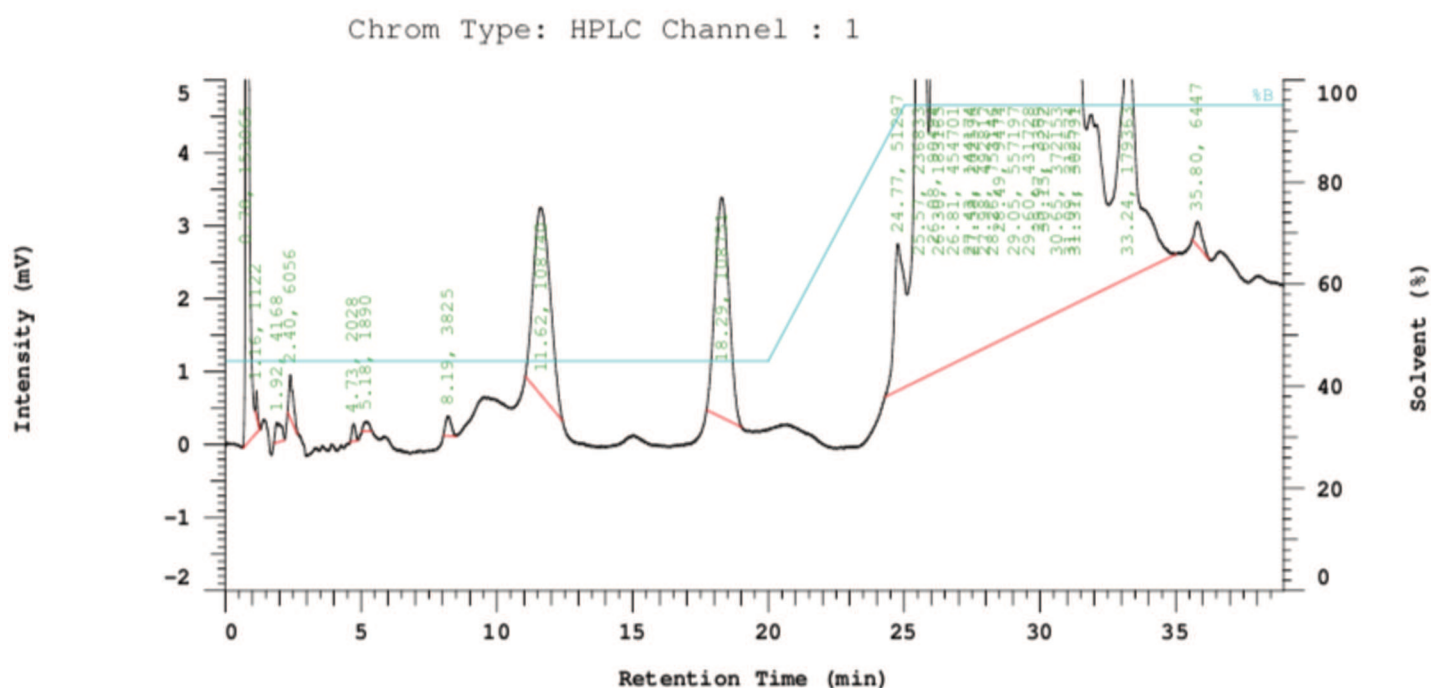


Figura 24 - Cromatograma do compósito Admira® Fusion polimerizado, no qual o *pellet* foi separado da solução ao fim de 180 minutos.

- O cromatograma da Figura 25 é relativo à amostra da resina Enamel *plus* HRI® Universal Dentin não polimerizada. Podemos identificar neste gráfico monómeros de HEMA ($T_R = 2,73$; $A = 47346$), de Bis-GMA ($T_R = 8,78$; $A = 79280$) e de UDMA ($T_R = 17,89$; $A = 253046$).

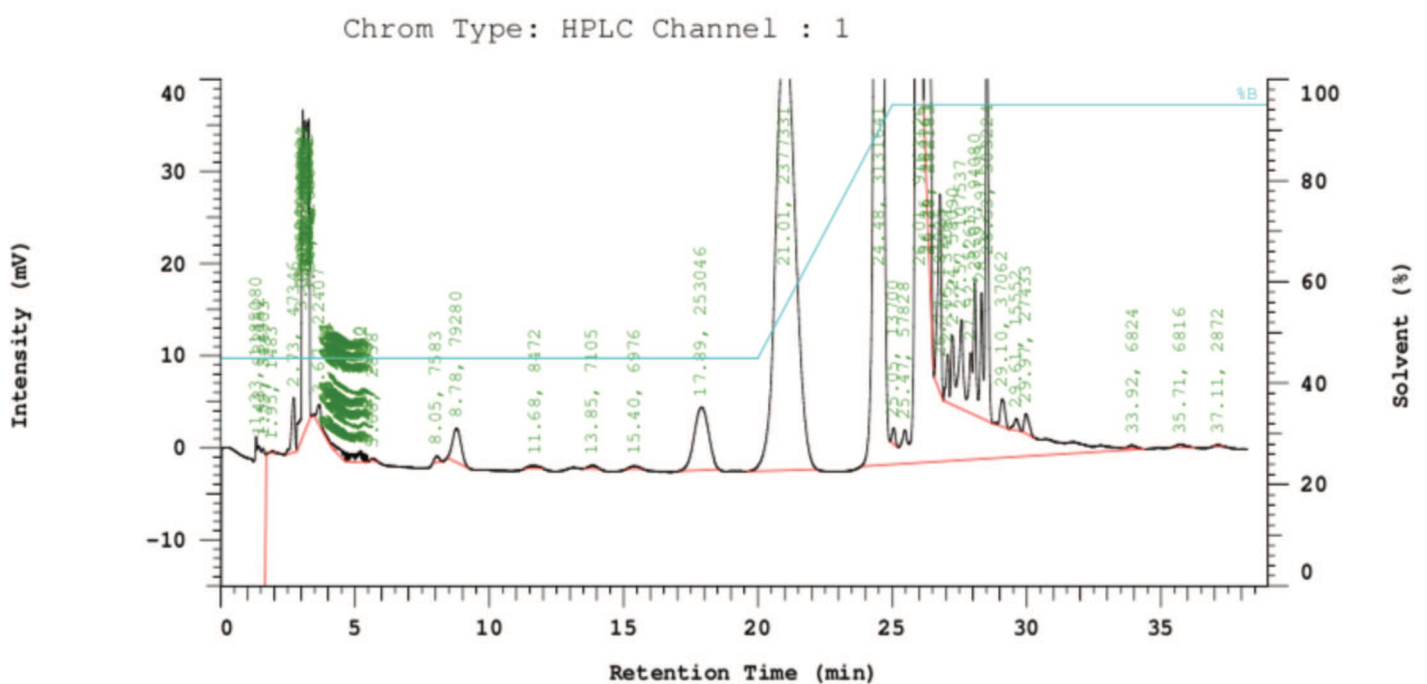


Figura 25 - Cromatograma do compósito da Enamel *plus* HRi® Universal Dentin não polimerizado.

- Na Figura 26 estão representados os constituintes do espécime da resina Enamel *plus* HRI[®] Bio Function não polimerizado. Neste cromatograma apenas identificamos monómeros de UDMA ($T_R = 12,07$; A= 13206).

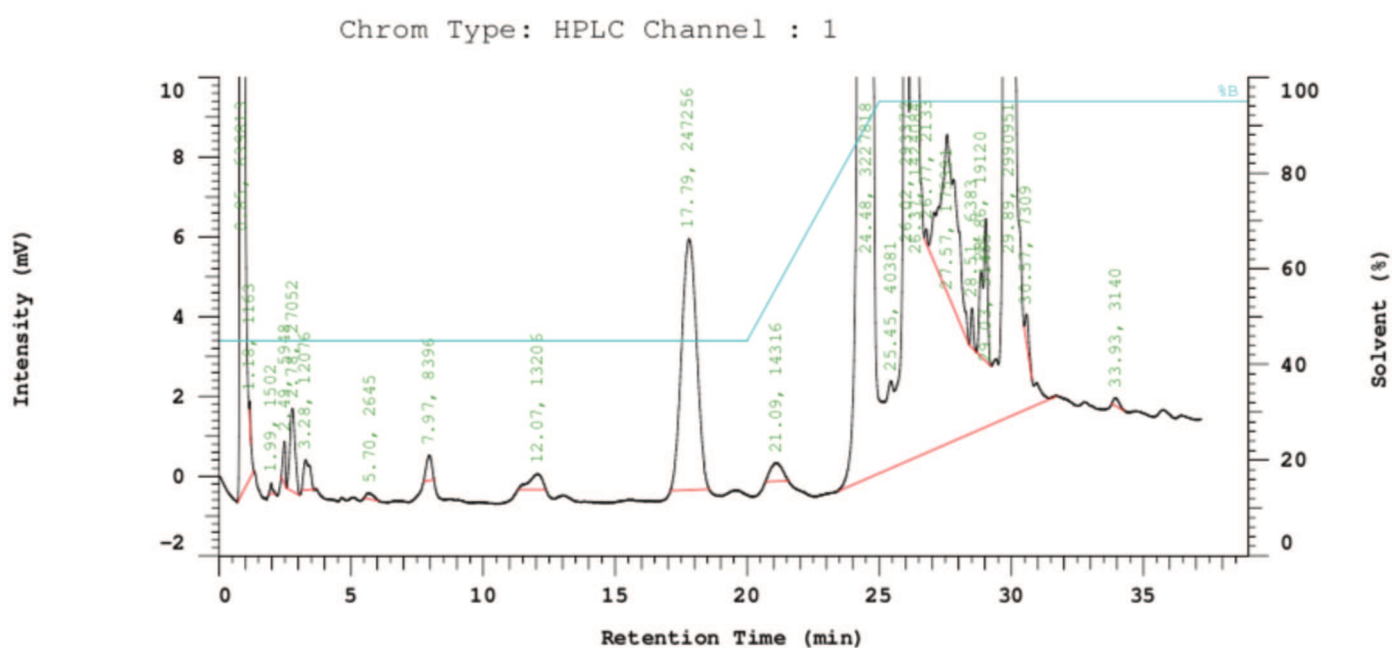


Figura 26 - Cromatograma do composto Enamel *plus* HRI[®] Bio Fuction não polimerizado.

- O cromatograma da Figura 27 é referente à amostra da resina Filtek[®] One Bulk Fill Restorative não polimerizada. Conseguimos observar picos de TEGDMA (T_R = 4,07; A= 655371) e de UDMA (T_R = 13,24; A= 219951).

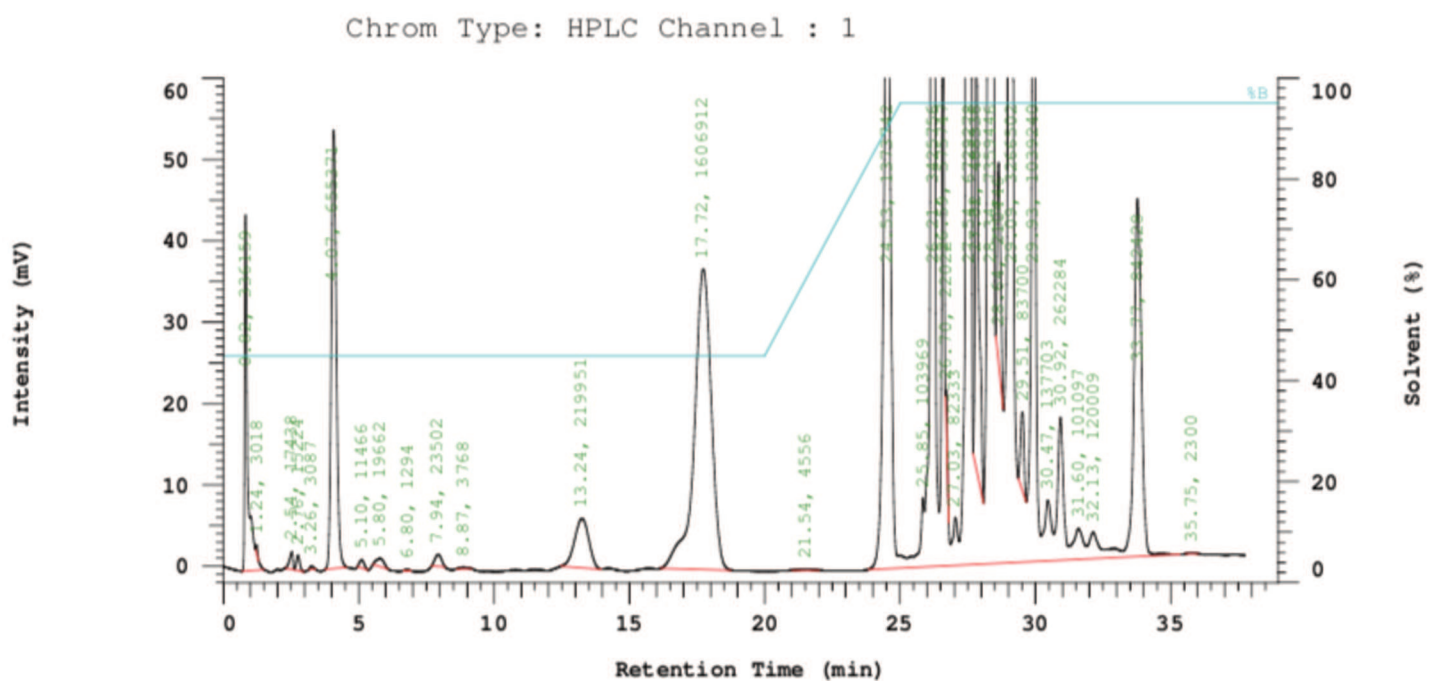
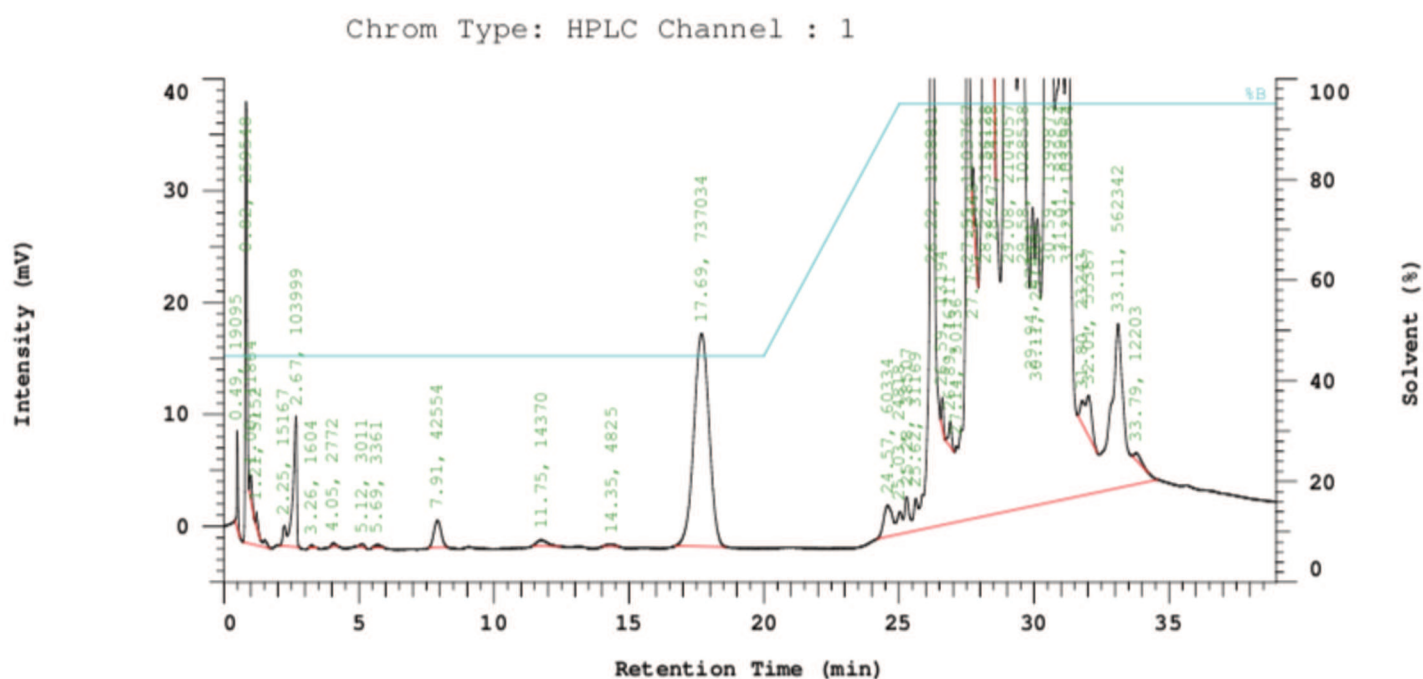


Figura 27 - Cromatograma do compósito Filtek[®] One Bulk Fill Restorative não polimerizado.

- A Figura 28 apresenta os componentes presentes no espécime do compósito Admira® Fusion não polimerizado. Este exibe picos correspondentes a monómeros de HEMA ($T_R = 2,67$; $A = 103999$) e de UDMA ($T_R = 11,75$; $A = 14370$).



De um modo sistematizado e para melhor percepção dos dados, a Tabela 4 apresenta os resultados obtidos nos cromatogramas das várias amostras analisadas, nos três métodos utilizados.

Tabela 4 - Monómeros identificados nos cromatogramas das resinas analisadas nos vários métodos efetuados, com indicação dos tempos de retenção (T_R) e áreas associadas aos picos (A).

Cromatograma Compósito	18 minutos	180 minutos	Não polimerizadas
Enamel <i>plus</i> HRI [®] Universal Dentin	HEMA: $T_R=2,60$; A=30496 Bis-GMA: $T_R=9,56$; A=41254 UDMA: $T_R=12,55$; A=30291	HEMA: $T_R=2,41$; A=5824 Bis-GMA: $T_R=8,50$; A=10443 UDMA: $T_R=13,07$; A=35073	HEMA: $T_R=2,73$; A=47346 Bis-GMA: $T_R=8,78$; A=79280 UDMA: $T_R=17,89$; A=253046
Enamel <i>plus</i> HRI [®] Bio Function	UDMA: $T_R=12,14$; A=12012	UDMA: $T_R=12,72$; A=10161	UDMA: $T_R=12,07$; A=13206
Filtek [®] One Bulk Fill Restorative	Pico equivalente a TEGDMA: $T_R=4,94$; A=33548 UDMA: $T_R=12,92$; A=3635	Pico equivalente a TEGDMA: $T_R=4,63$; A=195913 UDMA: $T_R=13,86$; A=25118	Pico equivalente a TEGDMA: $T_R=4,07$; A=655371 UDMA: $T_R=13,24$; A=219951
Admira [®] Fusion	Pico equivalente a HEMA: $T_R=2,34$; A=18405 Pico equivalente a UDMA: $T_R=12,75$; A=6299	Pico equivalente a HEMA: $T_R=2,40$; A=6056 Pico equivalente a UDMA: $T_R=11,62$; A=108740	Pico equivalente a HEMA: $T_R=2,67$; A=103999 Pico equivalente a UDMA: $T_R=11,75$; A=14370

IV. DISCUSSÃO

A polimerização das resinas compostas fotopolimerizadas ocorre por meio de uma reação exotérmica de adição, que promove a formação de um polímero tridimensional através de ligações cruzadas intermoleculares, iniciada por radicais livres. Esta reação inclui três fases: Indução, Propagação e Terminação (Denis et al., 2015).

Esta reação de polimerização nunca abrange por completo toda a matriz resinosa, pois existe sempre uma grande quantidade de monómeros residuais remanescentes que não reagem. Estes excedentes, dependendo da quantidade que não reage e que entra em contacto direto com os tecidos orais, são os que poderão causar efeitos adversos no organismo humano. Estes monómeros residuais podem atingir a câmara pulpar dentária através dos túbulos dentinários (Ferracane, 2011; Goldberg, 2008).

Um parâmetro importante na separação e identificação dos monómeros residuais, que se libertam do compósito após a reação de polimerização, é o solvente usado para fazer a eluição dos compostos, que irá influenciar significativamente a quantidade e a qualidade extraída (Moharamzadeh, Van Noort, Brook, & Scutt, 2007).

Estudos indicam que a quantidade de monómeros libertados de compósitos dentários varia consoante a alteração do meio de imersão. Está patente na literatura uma grande variabilidade de solventes utilizados para avaliar a libertação de monómeros, nomeadamente a água destilada, saliva artificial, etanol, metanol, acetonitrilo, etc. De acordo com os resultados, concluiu-se que o tipo de solvente onde a resina é imergida, desempenha o papel mais importante na eluição dos compostos (Ferracane & Condon, 1990; Gul et al., 2014; Sideridou & Achilias, 2005).

Como já referido anteriormente, os compósitos dentários possuem compostos que na sua forma livre são tóxicos para o organismo humano, nomeadamente o bisfenol A. O dano potencial do bisfenol A aumentou a consciencialização social na última década, devido à reação das agências reguladoras quanto ao uso deste composto em embalagens que estavam em contato com fontes alimentares. O bisfenol A, apesar de não existir na

sua forma pura, faz parte da constituição de muitos dos monómeros à base de metacrilato presentes em resinas compostas dentárias, como o Bis-GMA e o Bis-EMA. (Cao et al., 2010; Dursun et al., 2016; Fleisch et al., 2010).

No entanto, a indústria da medicina dentária está a adaptar-se às exigências do mercado, tentando oferecer alternativas às resinas compostas com bisfenol A. Por exemplo, em 2015, um material restaurador dentário à base de resina foi lançado no mercado, alegadamente livre de monómeros com bisfenol A ou qualquer outro monómero baseado em metacrilato, e comercializado como *Admira® Fusion* (Klauer, Belli, Petschelt, & Lohbauer, 2018).

Neste estudo, analisámos quatro resinas diferentes, que são frequentemente utilizadas para a confeção de restaurações dentárias definitivas diretas. O objetivo principal era analisar as resinas *Enamel plus HRi® Bio Function* (Micerium), a *Filtek® One Bulk Fill Restorative* (3M ESPE) e a *Admira® Fusion* (VOCO), e verificar se os monómeros de Bis-GMA se encontravam efetivamente ausentes da sua composição. Utilizámos também a resina *Enamel plus HRi® Universal Dentin* (Micerium), para comparar os compostos libertados desta, com os das resinas principais ditas como livres de Bis-GMA, visto que a MSDS (*Material Safety Data Sheet*) desta resina refere a presença destes monómeros na sua composição.

De forma a conseguirmos separar uma quantidade significativa de monómeros dos compósitos polimerizados passíveis de serem detetados no cromatógrafo, utilizámos como solvente para a eluição uma mistura de água e etanol numa razão de 25% de água e 75% de etanol, método já anteriormente aplicado num estudo realizado por Sideridou & Achilias, no qual foi estudada a eluição de monómeros de Bis-GMA, TEGDMA, UDMA e Bis-EMA através do HPLC (Sideridou & Achilias, 2005).

Segundo Ferracane & Condon, 75% dos monómeros residuais que não reagiram, foram eluídos nas primeiras três horas após colocação em solução de água/etanol. Nos nossos resultados, verificámos que a diferença de monómeros libertados entre as amostras de resina em solução durante 18 minutos e durante 180 minutos não era significativa, apesar de haver um ligeiro aumento da concentração de substâncias detetadas pelo HPLC nas amostras eluídas em três horas (Ferracane & Condon, 1990).

Estudos semelhantes para identificação e quantificação de monómeros libertados de compósitos, nas quais foram utilizados modelos de saliva artificial como solventes, não demonstraram resultados tão favoráveis na eluição dos compostos das resinas, pois apresentam um baixo nível de introdução na rede do polímero, não sendo por isso o melhor método de separação dos monómeros (Danesh et al., 2012; Gul, Miloglu, Akgul, & Kadioglu, 2013; Michelsen et al., 2008).

Através da análise por HPLC das soluções padrão, obtivemos os respectivos cromatogramas em que foi possível identificar o tempo de retenção dos monómeros de HEMA, TEGDMA, MMA e UDMA.

Tendo em conta que não foi possível obter o padrão de Bis-GMA, não se conseguiu adquirir experimentalmente através do HPLC o tempo de retenção deste composto no cromatograma.

Contudo, de acordo com alguns estudos anteriores em que foram analisados padrões de Bis-GMA em condições semelhantes, concluímos que o tempo de retenção deste monómero, encontra-se entre os 8,7 e os 10,4 minutos (Alshali et al., 2015; Denis et al., 2015). Utilizaram-se, portanto, estes dados como referência, de modo a ser possível identificar este composto nas resinas estudadas.

Nos cromatogramas das amostras de resina Enamel *plus* HRi® Universal Dentin, obtiveram-se picos bem definidos nos tempos de retenção correspondentes aos padrões de HEMA, Bis-GMA e UDMA.

Nos cromatogramas das amostras de resina Enamel *plus* HRi® Bio Function, foram registados picos definidos nos tempos de retenção atribuídos ao UDMA. No entanto, foram detetados picos em tempos de retenção compatíveis com os monómeros de Bis-GMA em dois cromatogramas referentes a esta resina. Contudo, não podemos afirmar que seja de facto este composto, podendo tratar-se de outro monómero equivalente com propriedades semelhantes, além de que o fabricante refere que o Bis-GMA não faz parte da constituição desta resina. Para verificar com exatidão de que composto se trata, deverá ser efetuada uma análise por espectrometria de massa, cujo princípio básico reside na geração de iões a partir de compostos orgânicos/inorgânicos e

na sua separação por massa/carga, fornecendo-nos informação sobre a estrutura de cada componente individualizado. A técnica de cromatografia líquida apenas faz a separação dos componentes de uma mistura (Gross, 2011; Tomer, 2001).

Na resina Filtek[®] One Bulk Fill Restorative (3M ESPE), detetaram-se compostos nos tempos de retenção equivalentes ao UDMA e TEGDMA, sendo que a informação fornecida pelo fabricante apenas remetia para a presença de UDMA na composição da matriz orgânica de resina.

Na análise da resina Admira[®] Fusion (VOCO), obtivemos picos nos tempos de retenção que poderão corresponder aos monómeros de HEMA e UDMA.

Perante os resultados obtidos neste estudo, verificou-se que os monómeros de Bis-GMA não se encontram presentes nos materiais restauradores analisados, conforme definido pelo fabricante.

É importante referir que existiram algumas diferenças entre as áreas de alguns picos obtidos nos diferentes procedimentos realizados, como por exemplo no caso do cromatograma da amostra de resina Admira[®] Fusion (VOCO) não polimerizada, cujo pico no tempo de retenção de 11,75 minutos possui uma área de 14370. Seria de esperar que a concentração de monómeros detetados nesse tempo fosse muito mais elevada que no cromatograma da mesma resina polimerizada e eluída durante 180 minutos, em que área do pico no tempo de retenção 11,62 minutos foi de 108740. Isto pode, eventualmente, dever-se ao facto da dificuldade na preparação das amostras não polimerizadas, pois as condições ideais para obtenção destes espécimes seriam um meio onde não houvesse qualquer fonte de luz, visto ser este o principal elemento de indução da polimerização das resinas.

De acordo com a bibliografia disponível, não foram realizadas experiências utilizando o método de preparação de espécimes de resina não polimerizados, pelo que futuramente este poderá vir a ser um procedimento a utilizar. Contudo, sobre este processo, existem aspetos importantes a ter em conta que poderão influenciar de forma positiva, em termos quantitativos e qualitativos, a deteção de compostos presentes nestes

materiais. Os principais obstáculos a esta forma de análise são os fatores que induzem a polimerização dos monómeros.

O processo de polimerização é comumente ativado por três formas distintas: calor, luz e produtos químicos. A maior parte das resinas acrílicas, utilizadas na confecção das bases de próteses dentárias removíveis, são polimerizadas através do calor. Existem também sistemas polimerizados por meio de uma mistura de dois reagentes, como por exemplo a amina terciária (ativador) e o peróxido de benzoíla (iniciador), que quando combinados sofrem uma reação química gerando radicais que iniciam a polimerização. Os materiais utilizados neste estudo são, maioritariamente, polimerizados pela luz, em que os fótons provenientes de uma fonte de luz ativam o iniciador que irá gerar radicais livres, que por sua vez irão principiar o processo de polimerização. Estes iniciadores são ativados por luz visível. A canforoquinona, quando exposta a uma fonte de luz, tem a capacidade de originar radicais livres. Porém, fatores como a intensidade da luz, o ângulo de incidência do feixe e a distância da fonte de luz ao compósito podem ter influência significativa no número de radicais livres formados (Anusavice et al., 2013).

Assim, tendo em conta estas condicionantes, em investigações futuras deverão ser tomadas medidas que previnam ao máximo a reação de polimerização das amostras de resina, a começar pela eliminação de qualquer fonte de luz aquando da preparação dos espécimes, e por exemplo a integração de um inibidor de polimerização (ex: BHT) na solução de AcN utilizada na eluição dos compósitos (Mousavinasab, 2011).

De realçar, também, que os cromatogramas apresentam escalas diferentes entre si devido à diversidade de concentrações dos compostos apresentadas em cada amostra, isto para permitir uma melhor visualização e interpretação dos picos.

Como referido, o método de HPLC utilizado foi o de fase reversa, e deste modo conseguimos comparar a polaridade dos principais monómeros detetados. Os primeiros compostos a serem registados no cromatograma num menor intervalo de tempo, são os que se apresentam com maior polaridade, pois sendo a natureza da coluna apolar, quanto menor polaridade os compostos apresentarem, maior será a sua retenção na coluna (Thammana, 2016). Por ordem crescente de polaridade dos compostos padrão temos: UDMA, MMA, TEGDMA e HEMA.

Nos cromatogramas obtidos, podemos verificar que existem diversos picos registados quando ocorre a alteração das percentagens dos solventes, ou seja, quando a percentagem do AcN aumenta para os 95%. Estes compostos, não identificados, tratam-se provavelmente de dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc. Contudo, apenas recorrendo à espectrometria de massa poderíamos identificar estes compostos com maior exatidão.

V. CONCLUSÕES

1. Conclusão

Dentro das limitações deste estudo e de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Existe uma maior quantidade de compostos diferentes detetados, através da análise por HPLC, nas amostras de resina não polimerizadas do que nas de resinas polimerizadas.
- Na análise das amostras de resina não polimerizadas verificou-se uma maior concentração dos monómeros residuais existentes.
- A maior parte dos monómeros libertados pelo compósito polimerizado ocorre logo nos primeiros minutos após a polimerização.
- O Bis-GMA encontra-se presente apenas na resina Enamel *plus* HRi[®] Universal Dentin, não tendo sido identificado nas restantes conforme descrito na composição apresentada pelos fabricantes.

2. Perspetivas Futuras

Este trabalho poderá ser o precursor de investigações futuras, em que sejam controlados de melhor forma os meios de preparação das amostras não polimerizadas, de modo a reduzir a sua polimerização e possibilitar a deteção de uma maior quantidade de compostos diferentes. O seguimento deste estudo, seria submeter estas amostras à espectrometria de massa, em que seria realizada a atribuição molecular de cada monómero e a sua identificação concreta.

Outra avaliação interessante que se poderá realizar é a análise das amostras através do microscópio de força atómica (AFM), para se visualizar o tamanho e conformação das moléculas em solução, e possivelmente, visualizar as partículas que ficaram no precipitado do tubo de *eppendorf* aquando da centrifugação das amostras não polimerizadas.

Deverão ser também realizados outros estudos sobre estes compostos mais recentes presentes nas resinas analisadas, como por exemplo o AUDMA, presente na resina Filtek[®] One Bulk Fill Restorative (3M ESPE), ou TCDDMDMA, que faz parte da composição da resina Enamel *plus* HRi[®] Bio Function (Micerium), quanto à sua estrutura, mecanismo de ação e liberação, e toxicidade para o organismo humano.

VI. BIBLIOGRAFIA

3M ESPE (2017). Obtido a 17 de Setembro de 2018 de <http://www.3m.com/>

Alexander, G., Hopcraft, M. S., Tyas, M. J., & Wong, R. H. (2014). Dentists' restorative decision-making and implications for an 'amalgamless' profession. Part 1: a review. *Aust Dent J* 59(4): 408-19. DOI: 10.1111/adj.12209.

Alshali, R. Z., Salim, N. A., Sung, R., Satterthwaite, J. D., & Silikas, N. (2015). Analysis of long-term monomer elution from bulk-fill and conventional resin-composites using high performance liquid chromatography. *Dent Mater* 31(12): 1587-98. DOI: 10.1016/j.dental.2015.10.006.

Alzraikat, H., Burrow, M. F., Maghaireh, G. A., & Taha, N. A. (2018). Nanofilled Resin Composite Properties and Clinical Performance: A Review. *Oper Dent* 43(4): E173-E190. DOI: 10.2341/17-208-T.

American Dental Association Council on Scientific Affairs (2014). Determination of bisphenol a released from resin-based composite dental restoratives. *J Am Dent Assoc* 145(7): 763-5. DOI: 10.14219/jada.2014.42.

Andreani, L., Silva, L. L., Witt, M. A., Meier, M. M., Joussef, A. C., & Soldi, V. (2012). Development of dental resinous systems composed of bisphenol a ethoxylated dimethacrylate and three novel methacrylate monomers: Synthesis and characterization. *Journal of Applied Polymer Science* 128(1): 725-734. DOI: 10.1002/app.38252.

Anusavice, K. J., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). *Phillips' Science of Dental Materials* (12th Ed.). St. Louis, Missouri: Saunders.

Babakhin, A. A., Volozhin, A. I., Zhuravleva, A. A., Kazarina, L. N., Babakhina, I.A., Dubova, L. V., & DuBuske, L. M. (2008). Histamine releasing and

- immunomodulating activity of dental restorative materials. *Stomatologia (Mosk)* 87(4): 4-10. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18833129>
- Berge, T. L. L., Lygre, G. B., Lie, S. A., & Björkman, L. (2018). Polymer-based dental filling materials placed during pregnancy and risk to the foetus. *BMC Oral Health* 18(1): 144. DOI: 10.1186/s12903-018-0608-1.
- Bonefeld-Jørgensen, E. C., Long, M., Hofmeister, M. V., & Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1: 69-76. DOI: 10.1289/ehp.9368.
- Cao, X. L., Corriveau, J., & Popovic, S. (2010). Sources of low concentrations of bisphenol A in canned beverage products. *J Food Prot* 73(8): 1548-51. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20819371>
- Catrau, M., & Barahona, I. (2015). Caracterização dos monómeros de diferentes resinas por HPLC (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Danesh, G., Hellak, T., Reinhardt, K. J., Végh, A., Schäfer, E., & Lippold, C. (2012). Elution characteristics of residual monomers in different light- and auto-curing resins. *Exp Toxicol Pathol* 64(7-8): 867-72. DOI: 10.1016/j.etp.2011.03.008.
- Dekant, W., & Völkel, W. (2008). Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 228(1): 114-34. DOI: 10.1016/j.taap.2007.12.008.
- Demarco, F. F., Corrêa, M. B., Cenci, M. S., Moraes, R. R., & Opdam, N. J. (2012). Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater* 28(1): 87-101. DOI: 10.1016/j.dental.2011.09.003.
- Denis, A. B., Diagone, C. A., Plepis, A. M., & Viana, R. B. (2015). The effect of the polymerization initiator and light source on the elution of residual Bis-GMA and

- TEGDMA monomers: A study using liquid chromatography with UV detection. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 151: 908-15. DOI: 10.1016/j.saa.2015.07.040.
- Durner, J., Spahl, W., Zaspel, J., Schweikl, H., Hickel, R., & Reichl, F. X. (2010). Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their Nernst partition coefficient. *Dent Mater* 26(1): 91-9. DOI: 10.1016/j.dental.2009.08.014.
- Dursun, E., Fron-Chabouis, H., Attal, J. P., & Raskin, A. (2016). Bisphenol A Release: Survey of the Composition of Dental Composite Resins. *Open Dent J* 10: 446-453. DOI: 10.2174/1874210601610010446.
- Fedorowicz, Z., Nasser, M., & Wilson, N. (2009). Adhesively bonded versus non-bonded amalgam restorations for dental caries. *Cochrane Database Syst Rev* (4): CD007517. DOI: 10.1002/14651858.CD007517.pub2
- Ferracane, J. L. (2011). Resin composite--state of the art. *Dent Mater* 27(1): 29-38. DOI: 10.1016/j.dental.2010.10.020.
- Ferracane, J. L., & Condon, J. R. (1990). Rate of elution of leachable components from composite. *Dental Materials* 6(4): 282-287. DOI: 10.1016/s0109-5641(05)80012-0.
- Fleisch, A. F., Sheffield, P. E., Chinn, C., Edelstein, B. L., & Landrigan, P. J. (2010). Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics* 126(4): 760-8. DOI: 10.1542/peds.2009-2693.
- Floyd, C. J., & Dickens, S. H. (2006). Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dent Mater* 22(12): 1143-9. DOI: 10.1016/j.dental.2005.10.009.
- Fortin, D., & Vargas, M. A. (2000). The spectrum of composites: new techniques and materials. *J Am Dent Assoc* 131 Suppl: 26S-30S. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860342>

- Fúcio, S. B., Paula, A. B., Sardi, J. C., Duque, C., Correr-Sobrinho, L., & Puppin-Rontani, R. M. (2016). Streptococcus Mutans Biofilm Influences on the Antimicrobial Properties of Glass Ionomer Cements. *Braz Dent J* 27(6): 681-687. DOI: 10.1590/0103-6440201600655.
- Gajewski, V. E., Pfeifer, C. S., Fróes-Salgado, N. R., Boaro, L. C., & Braga, R. R. (2012). Monomers used in resin composites: degree of conversion, mechanical properties and water sorption/solubility. *Braz Dent J* 23(5): 508-14. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306226>
- Gayrard, V., Lacroix, M. Z., Collet, S. H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P. L., & Picard-Hagen, N. (2013). High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect* 121(8): 951-6. DOI: 10.1289/ehp.1206339.
- Gilmour, A. S., Latif, M., Addy, L. D., & Lynch, C. D. (2009). Placement of posterior composite restorations in United Kingdom dental practices: techniques, problems, and attitudes. *Int Dent J* 59(3): 148-54. DOI: 10.1922/IDJ_2081Lynch07.
- Goldberg, M. (2008). In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig* 12(1): 1-8. DOI: 10.1007/s00784-007-0162-8.
- Gordan, V. V., Riley, J. L., Geraldeli, S., Rindal, D. B., Qvist, V., Fellows, J. L., Kellum, H. P., Gilbert, G. H., & Dental Practice-Based Research Network Collaborative Group (2012). Repair or replacement of defective restorations by dentists in The Dental Practice-Based Research Network. *J Am Dent Assoc* 143(6): 593-601. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22653939>
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry* (2nd Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Gul, P., Miloglu, F. D., & Akgul, N. (2014). HPLC analysis of eluted monomers from

- dental composite using different immersion media. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 37(2), 155–170. DOI: 10.1080/10826076.2012.738619.
- Gul, P., Miloglu, F., Akgul, N., & Kadioglu, Y. (2013). Effect of Different Extraction Media on Quantification of the Released Monomers from Dental Composite. *Asian Journal of Chemistry*, 25(6): 2994-3000. DOI: 10.14233/ajchem.2013.13471.
- Gupta, S. K., Saxena, P., Pant, V. A., & Pant, A. B. (2012). Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicol Int* 19(3): 223-34. DOI: 10.4103/0971-6580.103652.
- Hegde, M., & Wali, A. (2015). BisGMA and TEGDMA Elution from Two Flowable Nanohybrid Resin Composites: An In vitro Study. *British Journal of Medicine and Medical Research* 5(9): 1096-1104. DOI: 10.9734/bjmmr/2015/12951.
- Heintze, S. D., & Rousson, V. (2012). Clinical effectiveness of direct class II restorations - a meta-analysis. *J Adhes Dent* 14(5): 407-31. DOI: 10.3290/j.jad.a28390.
- Hervás-García, A., Martínez-Lozano, M. A., Cabanes-Vila, J., Barjau-Escribano, A., & Fos-Galve, P. (2006). Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11(2): E215-20. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505805>
- Imazato, S., Horikawa, D., Takeda, K., Kiba, W., Izutani, N., Yoshikawa, R., Hayashi, M., Ebisu, S., & Nakano, T. (2010). Proliferation and differentiation potential of pluripotent mesenchymal precursor C2C12 cells on resin-based restorative materials. *Dent Mater J* 29(3): 341-6. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467157>
- Issa, Y., Watts, D. C., Brunton, P. A., Waters, C. M., & Duxbury, A. J. (2004). Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dent Mater* 20(1): 12-20. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698769>

- Kim, J. W., Kim, L. U., Kim, C. K., Cho, B. H., & Kim, O. Y. (2006). Characteristics of Novel Dental Composites Containing 2,2-Bis[4-(2-methoxy-3-methacryloyloxypropoxy) phenyl] propane as a Base Resin. *Biomacromolecules* 7(1): 154-160. DOI: 10.1021/bm050491l.
- Kingman, A., Hyman, J., Masten, S. A., Jayaram, B., Smith, C., Eichmiller, F., Arnold, M. C., Wong, P. A., Schaeffer, J. M., Solanki, S., & Dunn, W. J. (2012). Bisphenol A and other compounds in human saliva and urine associated with the placement of composite restorations. *J Am Dent Assoc* 143(12): 1292-302. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204083>
- Klauer, E., Belli, R., Petschelt, A., & Lohbauer, U. (2018). Mechanical and hydrolytic degradation of anOrmocer®-based Bis-GMA-free resin composite. *Clin Oral Investig*. DOI: 10.1007/s00784-018-2651-3.
- Kopperud, S. E., Tveit, A. B., Gaarden, T., Sandvik, L., & Espelid, I. (2012). Longevity of posterior dental restorations and reasons for failure. *Eur J Oral Sci* 120(6): 539-48. DOI: 10.1111/eos.12004.
- Kovarik, R. E. (2009). Restoration of posterior teeth in clinical practice: evidence base for choosing amalgam versus composite. *Dent Clin North Am* 53(1): 71-6. DOI: 10.1016/j.cden.2008.11.001.
- Krämer, N., García-Godoy, F., & Frankenberger, R. (2005). Evaluation of resin composite materials. Part II: in vivo investigations, *Am J Dent* 18(2): 75-81. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973822>
- Liu, F., Sun, B., Jiang, X., Aldeyab, S. S., Zhang, Q., & Zhu, M. (2014). Mechanical properties of dental resin/composite containing urchin-like hydroxyapatite. *Dent Mater* 30(12): 1358-68. DOI: 10.1016/j.dental.2014.10.003.

- Llena, C., Fernández, S., & Forner, L. (2016). Color stability of nanohybrid resin-based composites, ormocers and compomers. *Clin Oral Investig* 21(4): 1071-1077. DOI: 10.1007/s00784-016-1850-z.
- Mariotti, A., Söderholm, K. J., & Johnson, S. (1998). The in vivo effects of bisGMA on murine uterine weight, nucleic acids and collagen. *Eur J Oral Sci* 106(6): 1022-7. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9879914>
- Maserejian, N. N., Trachtenberg, F. L., Wheaton, O. B., Calafat, A. M., Ranganathan, G., Kim, H. Y., Hauser, R. (2016). Changes in urinary bisphenol A concentrations associated with placement of dental composite restorations in children and adolescents. *J Am Dent Assoc* 147(8): 620-30. DOI: 10.1016/j.adaj.2016.02.020.
- Micerium. (2017). Obtido a 17 de Setembro de 2018 de <http://www.micerium.com>
- Michelsen, V. B., Moe, G., Strøm, M. B., Jensen, E., & Lygre, H. (2008). Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards. *Dent Mater* 24(6): 724-31. DOI: 10.1016/j.dental.2007.08.002.
- Milnar, F. J. (2011). The Evolution of Direct Composites. *Compend Contin Educ Dent* 32(1): 79-82, 84-90, 92-4. Disponível em <https://www.aegisdentalnetwork.com/cced/2011/02/the-evolution-of-direct-composites>
- Mitchell, R. J., Koike, M., & Okabe, T. (2007). Posterior amalgam restorations--usage, regulation, and longevity. *Dent Clin North Am* 51(3): 573-89. DOI: 10.1016/j.cden.2007.04.004.
- Moharamzadeh, K., Van Noort, R., Brook, I. M., & Scutt, A. M. (2007). HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media. *J Mater Sci Mater Med* 18(1): 133-7. DOI: 10.1007/s10856-006-0671-z.

- Moraes, R. R., Gonçalves, L. S., Lancellotti, A. C., Consani, S., Correr-Sobrinho, L., & Sinhoreti, M. A. (2009). Nanohybrid resin composites: nanofiller loaded materials or traditional microhybrid resins? *Oper Dent* 34(5): 551-7. DOI: 10.2341/08-043-L.
- Moszner, N., Gianasmidis, A., Klapdohr, S., Fischer, U. K., & Rheinberger, V. (2008). Sol-gel materials 2. Light-curing dental composites based on ormocers of cross-linking alkoxysilane methacrylates and further nano-components. *Dent Mater* 24(6): 851-6. DOI: 10.1016/j.dental.2007.10.004.
- Mousavinasab, S. M. (2011). Biocompatibility of composite resins. *Dent Res J (Isfahan)* 8(1): S21-9. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23372592>
- Negri-Cesi, P. (2015). Bisphenol A Interaction With Brain Development and Functions. *Dose Response* 13(2): 1-12. DOI: 10.1177/1559325815590394.
- Nicholson, J. W., & Czarnecka, B. (2008). The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater* 24(12): 1702-8. DOI: 10.1016/j.dental.2008.04.005.
- Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., & Yokota, H. (2010). Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environmental Health Perspectives* 118(9): 1196-1203. DOI: 10.1289/ehp.0901575.
- Ogliari, F. A., Ely, C., Zanchi, C. H., Fortes, C. B., Samuel, S. M., Demarco, F. F., Petzhold, C. L., & Piva, E. (2008). Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. *Dent Mater* 24(2): 165-71. DOI: 10.1016/j.dental.2007.03.007.
- Opdam, N. J., Bronkhorst, E. M., Loomans, B. A., & Huysmans, M. C. (2010). 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. *J Dent Res* 89(10): 1063-7. DOI: 10.1177/0022034510376071.

- Pina, C., Félix, S., Caldeira, J., & Carvalho, J. (2017). Caracterização por HPLC dos monómeros de duas resinas utilizadas em prótese removível: Probase® Hot e Probase® Cold. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Qiao, G., Li, H., Xu, D., & Park, S. (2012). Modified a Colony Forming Unit Microbial Adherence to Hydrocarbons Assay and Evaluated Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Production of *Vibrio scophthalmi*. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 3(1):130. DOI: 10.4172/2155-9597.1000130.
- Randolph, L. D., Palin, W. M., Leloup, G., & Leprince, J. G. (2016). Filler characteristics of modern dental resin composites and their influence on physico-mechanical properties. *Dent Mater* 32(12): 1586-1599. DOI: 10.1016/j.dental.2016.09.034.
- Rogatsky, E. (2016). Modern High Performance Liquid Chromatography and HPLC 2016 International Symposium. *Journal of Chromatography & Separation Techniques* 7(4). DOI: 10.4172/2157-7064.1000e135
- Salgado, V. E., Cavalcante, L. M., Moraes, R. R., Davis, H. B., Ferracane, J. L., & Schneider, L. F. (2017). Degradation of optical and surface properties of resin-based composites with distinct nanoparticle sizes but equivalent surface area. *J Dent* 59: 48-53. DOI: 10.1016/j.jdent.2017.02.008.
- Schubert, A., Ziegler, C., Bernhard, A., Bürgers, R., & Miosge, N. (2018). Cytotoxic effects to mouse and human gingival fibroblasts of a nanohybrid ormocer versus dimethacrylate-based composites. *Clin Oral Investig*. DOI: 10.1007/s00784-018-2419-9.
- Sharma, S., Padda, B. K., & Choudhary, V. (2012). Comparative evaluation of residual monomer content and polymerization shrinkage of a packable composite and an ormocer. *J Conserv Dent* 15(2): 161-5. DOI: 10.4103/0972-0707.94592.
- Sideridou, I. D., & Achilias, D. S. (2005). Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin

- composites using HPLC. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 74(1): 617-26. DOI: 10.1002/jbm.b.30252.
- Simecek, J. W., Diefenderfer, K. E., & Cohen, M. E. (2009). An evaluation of replacement rates for posterior resin-based composite and amalgam restorations in U.S. Navy and marine corps recruits. *J Am Dent Assoc* 140(2): 200-9. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188417>
- Soncini, J. A., Maserejian, N. N., Trachtenberg, F., Tavares, M., & Hayes, C. (2007). The longevity of amalgam versus compomer/composite restorations in posterior primary and permanent teeth: findings From the New England Children's Amalgam Trial. *J Am Dent Assoc* 138(6): 763-72. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545265>
- Stanislawski, L., Daniau, X., Lauti, A., & Goldberg, M. (1999). Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res* 48(3): 277-88. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398031>
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T., & Suzumori, K. (2005). Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 20(8): 2325-9. DOI: 10.1093/humrep/deh888.
- Tauböck, T. T., Jäger, F., Attin, T. (2018). Polymerization shrinkage and shrinkage force kinetics of high- and low-viscosity dimethacrylate- and ormocer-based bulk-fill resin composites. *Odontology*. DOI: 10.1007/s10266-018-0369-y.
- Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis RRJPA*, 5(2), 22–28.
- Tomer, K. B. (2001). Separations combined with mass spectrometry. *Chem Rev* 101(2): 297-328. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712249>

Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., Scheers, H., Godderis, L., Hoet, P., & Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater* 27(8): 723-47. DOI: 10.1016/j.dental.2011.05.001

VOCO (2015). *VOCO GmbH*. Obtido a 17 de Setembro de 2018 de <http://www.voco.com/>

Zimmers, S. M., Browne, E. P., O'Keefe, P. W., Anderton, D. L., Kramer, L., Reckhow, D. A., & Arcaro, K. F. (2014). Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. *Chemosphere* 104: 237-43. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.12.085.